

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 8 mars 2018

AVIS

de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

**relatif à « une demande de modification des annexes de la directive 2008/38/CE
visant la création d'un nouvel objectif nutritionnel particulier
'soutien des systèmes neurobiologiques pour les troubles liés au stress et à l'anxiété'
chez les chiens et les chats »**

L'Anses met en œuvre une expertise scientifique indépendante et pluraliste.

L'Anses contribue principalement à assurer la sécurité sanitaire dans les domaines de l'environnement, du travail et de l'alimentation et à évaluer les risques sanitaires qu'ils peuvent comporter.

Elle contribue également à assurer d'une part la protection de la santé et du bien-être des animaux et de la santé des végétaux et d'autre part à l'évaluation des propriétés nutritionnelles des aliments.

Elle fournit aux autorités compétentes toutes les informations sur ces risques ainsi que l'expertise et l'appui scientifique technique nécessaires à l'élaboration des dispositions législatives et réglementaires et à la mise en œuvre des mesures de gestion du risque (article L.1313-1 du code de la santé publique).

Ses avis sont publiés sur son site internet.

L'Anses a été saisie le 20 avril 2017 par la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes (DGCCRF) d'une demande de modification des annexes de la directive 2008/38/CE de la Commission du 5 mars 2008 établissant une liste de destinations des aliments pour animaux visant la création d'un nouvel objectif nutritionnel particulier « *soutien des systèmes neurobiologiques pour les troubles liés au stress et à l'anxiété* » chez les chiens et les chats.

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

Le règlement (CE) n° 767/2009 du Parlement européen et du Conseil du 13 juillet 2009 concernant la mise sur le marché et l'utilisation des aliments pour animaux prévoit, dans son chapitre 3, la mise sur le marché de types spécifiques d'aliments pour animaux, dont les aliments visant un objectif nutritionnel particulier (ONP). Un ONP est défini à l'article 3 comme « *un objectif qui consiste à satisfaire les besoins nutritionnels spécifiques d'animaux dont le processus d'assimilation, le processus d'absorption ou le métabolisme est ou risque d'être perturbé temporairement ou de manière irréversible et qui, de ce fait, peuvent tirer des bénéfices de l'ingestion d'aliments pour animaux appropriés à leur état* ». Cet article 3 définit un « *aliment pour animaux visant des objectifs nutritionnels particuliers* » comme « *un aliment pour animaux capable de répondre à un objectif nutritionnel particulier du fait de sa composition particulière ou de son procédé de fabrication particulier, qui le distingue clairement des aliments pour animaux ordinaires.* ».

¹ Modifié en dernier lieu par le règlement (UE) n° 939/2010 de la Commission du 20 octobre 2010 et rectifié au JOUE L 192 du 22.07.2011, page 71.

Le chapitre 3 énonce à l'article 9 que « *les aliments pour animaux visant des objectifs nutritionnels particuliers ne peuvent être commercialisés en tant que tels que si leur destination est incluse sur la liste établie conformément à l'article 10 et s'ils répondent aux caractéristiques nutritionnelles essentielles correspondant à l'objectif nutritionnel particulier qui figure sur cette liste* ». L'article 10, point 1, du même règlement, prévoit que « *la Commission peut mettre à jour la liste des destinations énoncées dans la directive 2008/38/CE en ajoutant ou en supprimant des destinations ou en ajoutant, supprimant ou modifiant les conditions associées à une destination donnée* ». Ces modifications peuvent être demandées par des pétitionnaires. L'article 10, point 2, indique que « *pour être recevable, la demande doit comporter un dossier démontrant que la composition spécifique de l'aliment pour animaux répond à l'objectif nutritionnel particulier auquel il est destiné et qu'il n'a pas d'effets négatifs sur la santé animale, la santé humaine, l'environnement ou le bien-être des animaux* ».

La directive 2008/38/CE de la Commission du 5 mars 2008 établissant une liste des destinations des aliments pour animaux visant des objectifs nutritionnels particuliers (ONP) a été prise en application de la directive 93/74/CEE qui prévoit l'établissement d'une liste positive des destinations des aliments pour animaux visant des objectifs nutritionnels particuliers. Cette liste doit mentionner la destination précise, à savoir l'objectif nutritionnel particulier, les caractéristiques nutritionnelles essentielles, les déclarations d'étiquetage et, le cas échéant, les indications particulières d'étiquetage.

Le dossier du pétitionnaire vise à créer un nouvel objectif nutritionnel particulier « *soutien du système neurobiologique pour les troubles liés au stress et à l'anxiété* » chez les chiens et les chats libellé comme suit :

Particular nutritional purpose	Essential nutritional characteristics	Species	Labelling declarations	Recommended	Other provisions
Support of neurobiological systems in stress and anxiety-related disorders*	<p>Increased level of Tryptophan and added milk protein hydrolysate</p> <p>Tryptophan $\geq 2,2$ g/kg** complete petfood with 12% moisture</p> <p>AND</p> <p>Milk protein hydrolysate containing minimum 1.8% alpha-s1-Cn ≥ 1.1 g/kg** complete petfood with 12% moisture</p>	Dogs	Tryptophan Hydrolysed milk protein powder	Initially up to 8 weeks, then up to 6 months	<p>Indicate in the indications for use :</p> <p>Water should be available at all times</p> <p>Indicate on the package, container or label:</p> <p>It is recommended that a veterinarian's opinion be sought before use</p>
	<p>Increased level of Tryptophan and added milk protein hydrolysate</p> <p>Tryptophan $\geq 3,4$ g/kg** complete petfood with 12% moisture</p> <p>AND</p> <p>Milk protein hydrolysate containing minimum 1.8% alpha-s1-Cn $\geq 0,9$ g/kg** complete petfood with 12% moisture</p>	Cats			

*Including feline idiopathic cystitis

**Based on petfood with an energy density of 4 000 kcal/kg DM

Conformément aux dispositions du règlement (CE) n°767/2009, la saisine ne porte pas sur une évaluation des caractéristiques nutritionnelles optimales pour répondre à l'objectif nutritionnel particulier, mais sur une appréciation des éléments fournis par le demandeur.

L'avis de l'Anses est donc exclusivement demandé sur l'adéquation des preuves fournies par le demandeur pour démontrer d'une part l'efficacité des caractéristiques nutritionnelles proposées au regard de l'objectif nutritionnel particulier recherché et, d'autre part, l'absence d'effets négatifs sur la santé animale, la santé humaine, l'environnement ou le bien-être des animaux.

Plus précisément, au cas d'espèce, l'avis de l'Anses est demandé sur les questions suivantes :

- un aliment pour animaux familiers ayant les caractéristiques suivantes (pour un aliment complet à 12 % d'humidité, ayant une teneur énergétique de 4 000 kcal/kg de matière sèche :
 - un taux de tryptophane supérieur ou égal à 2,2 g/kg d'aliment complet ;
 - un hydrolysate de protéines de lait contenant au moins 1,8 % d'alpha-S1-caséine et représentant au moins 1,1 g/kg d'aliment complet ;permet-il d'atteindre l'objectif de soutien des systèmes neurobiologiques face aux troubles liés au stress et à l'anxiété chez les chiens ?
- un aliment pour animaux familiers ayant les caractéristiques suivantes (pour un aliment complet à 12 % d'humidité, ayant une teneur énergétique de 4 000 kcal/kg de matière sèche :
 - un taux de tryptophane supérieur ou égal à 3,4 g/kg d'aliment complet ;
 - un hydrolysate de protéines de lait contenant au moins 1,8 % d'alpha-S1-caséine et représentant au moins 0,9 g/kg d'aliment complet ;permet-il d'atteindre l'objectif de soutien des systèmes neurobiologiques face aux troubles liés au stress et à l'anxiété chez les chats, y compris la cystite idiopathique féline ?
- les durées d'utilisation recommandées (8 semaines initialement puis jusqu'à 6 mois) sont-elles pertinentes et adaptées à l'ONP visé ?
- les autres dispositions prévues (l'animal devrait toujours avoir de l'eau à disposition) sont-elles pertinentes et adaptées à l'ONP visé ?

Dans le cas où l'Anses considérerait que les caractéristiques nutritionnelles sont pertinentes, mais que leur définition gagnerait à être précisée pour garantir l'efficacité de l'aliment pour répondre à ces objectifs, il lui est demandé de proposer si possible un complément de définition.

Par ailleurs, l'Anses pourra, si elle l'estime nécessaire, émettre toute recommandation qu'elle juge souhaitable sur les caractéristiques des aliments pour animaux destinées à répondre à cet objectif nutritionnel.

Ces recommandations devront cependant figurer dans l'avis de manière clairement séparée des réponses apportées aux questions de la saisine.

2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) ». L'Anses analyse les liens d'intérêts déclarés par les experts avant leur nomination et tout au long des travaux, afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise.

Les déclarations d'intérêts des experts sont publiées sur le site internet de l'Anses (www.anses.fr).

L'expertise collective portant sur l'adéquation scientifique du dossier au regard des caractéristiques nutritionnelles proposées a été réalisée par le comité d'experts spécialisé (CES) « Alimentation animale (ALAN) » sur la base d'un rapport initial rédigé par trois rapporteurs et présenté lors de la réunion du CES ALAN du 19 décembre 2017. Les rapporteurs se sont réunis par téléphone les 11 décembre 2017 et 7 février 2018. L'analyse et conclusions du CES a été discutée lors de la réunion du 16 janvier 2018 et validée lors de la réunion du 13 février 2018.

L'Agence nationale du médicament vétérinaire (ANMV) a par ailleurs élaboré son rapport sur la catégorisation du produit au regard de la réglementation sur les médicaments vétérinaires. Dans ce cadre, l'analyse du dossier a été effectuée par la mission des affaires juridiques et contentieuses de l'Anses-Agence nationale du médicament vétérinaire. Le département Autorisation de mise sur le marché a été consulté. Un échange a eu lieu entre le CES ALAN et l'ANMV le 19 décembre 2017.

Le présent document présente donc les conclusions du CES ALAN puis celles de l'ANMV et se termine par les conclusions de l'Agence.

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU CES ALAN

En préambule, le CES ALAN rappelle qu'il s'est précédemment prononcé sur deux demandes de créations d'ONP similaires (mais non identiques) portant sur les effets de la casozépine (Anses 2012, Anses 2015). Dans les deux cas, l'Anses a donné un avis défavorable aux demandes de création de nouveaux objectifs nutritionnels particuliers « *atténuation des réactions au stress chez les chiens et chats* » (Anses 7 décembre 2012) et « *soutien des chiens et des chats faisant face à des réactions au stress, ce qui réduira les comportements associés* » (Anses 6 janvier 2015). Dans l'avis du 7 décembre 2012, il a été indiqué que « *le dossier du pétitionnaire permet de montrer que l'apport de 15 mg/kg/j d'hydrolysats trypsiques de l'alpha1-caséine contenant au moins 1,8% d'alpha-casozépine permet de réduire les troubles émotionnels de chiens souffrant d'anxiété chronique* ». En outre, l'analyse scientifique du dossier a permis de conclure que :

- « *l'alpha-casozépine contenue dans l'hydrolysats trypsiques de caséine bovine possède une activité sur les récepteurs GABA de type A, 10 000 fois inférieure à celle du diazépam ;*
- *les essais cliniques présentés montrent des propriétés anxiolytiques chez le Rat, une efficacité sur des troubles liés au stress chez certaines personnes et une efficacité sur certains troubles d'origine purement émotionnelle chez le Chien. Chez le Chat, une efficacité sur les manifestations de l'anxiété suggérée par l'essai présenté doit être confirmée par d'autres études.* »

Dans l'avis du 6 janvier 2015, l'analyse du dossier a conduit aux conclusions suivantes : « *Toute référence à l'alpha-casozépine à une teneur minimale garantie a été retirée, sans mentionner d'éventuels autres peptides bioactifs. De plus, le nouveau dossier décrit un mécanisme liant stress, troubles digestifs et déficit en hydrolysats trypsiques de caséine bovine (HTCB) qui justifierait l'intérêt nutritionnel de l'HTCB, mais n'en apporte pas les preuves scientifiques. Par conséquent, le demandeur ne démontre pas l'efficacité des caractéristiques nutritionnelles au regard de l'objectif nutritionnel particulier recherché.*

Le dossier présenté par le pétitionnaire ne permet pas de montrer que l'apport de 1-3 g de HTCB/kg d'aliment complet garantit un « soutien des chats et chiens faisant face à des réactions au stress, ce qui réduira les comportements associés », dans la mesure où la suppression d'une teneur minimale garantie en alpha-casozépine dans l'HTCB, ou de tout autre peptide bio-actif rend la démonstration impossible. »

3.1. Contexte scientifique

3.1.1. Stress, anxiété et système neurobiologique

3.1.1.1. Définitions

Il existe de multiples définitions du **stress**, qui diffèrent parfois entre la terminologie conservée chez l'Homme et la terminologie largement acceptée en médecine vétérinaire.

Dans le Larousse médical, on peut trouver : « *état réactionnel de l'organisme soumis à une agression brusque* ».

Une agression déclenche une réaction immédiate (et une émotion nommée peur) du système nerveux végétatif (activation du système hypothalamo-sympathico-adrénergique conduisant à la libération de noradrénaline par l'hypothalamus et d'adrénaline par les glandes surrénales dans le

sang). L'activation de l'hypothalamus entraîne une stimulation de l'adénohypophyse (ACTH - hormone adrénocorticotrophine), d'où une stimulation de la production de cortisol et d'aldostérone par le cortex surrénalien. Le cortisol active alors en retour deux zones du cerveau : le cortex cérébral pour qu'il réagisse au stimulus stressant (fuite, attaque, immobilisation...), et l'hippocampe qui va apaiser la réaction. Le cortisol permet également une libération de glucose à partir des réserves de l'organisme pour répondre à une demande accentuée en énergie pour les muscles, le cœur, le cerveau... L'activation du système orthosympathique (adrénaline et noradrénaline) engendre notamment une tachycardie, une augmentation de la fréquence respiratoire, une vasodilatation musculaire et cérébrale, une augmentation du tonus musculaire, une vasoconstriction cutanée, une dilatation des bronchioles, une diminution de l'activité intestinale, de la diurèse, la conversion rapide du glycogène hépatique en glucose, une augmentation de la vigilance, permettant une réaction rapide de l'organisme.

Lorsque le stress reste mineur, il joue un rôle positif en améliorant les capacités d'adaptation à l'agression. Il n'en va pas de même en cas de stress intense et/ou prolongé. Si aucune solution immédiate ne parvient à désamorcer le facteur du stress, ou lorsque celui-ci nécessite un effort durable et répété, ou que ses conséquences risquent d'être graves, l'organisme ne parvient alors plus à trouver en lui les ressources nécessaires pour surmonter l'obstacle, c'est l'anxiété.

A partir du moment où les comportements de peur (1) sont déclenchés par des stimuli inoffensifs ou (2) atteignent une intensité ou une fréquence plus élevées que ce qui serait attendu dans une situation spécifique ou (3) affectent la sécurité de l'animal, sa qualité de vie ou sa relation avec le propriétaire, on parle de « troubles liés à l'anxiété » ou « anxiety (-related) disorders » (Béata *et al.* 2016).

L'anxiété peut être définie comme un trouble émotionnel caractérisé par la production de symptômes analogues à ceux de la peur (ou déclenchés par un stress), mais déclenché par un stimulus indéterminé ou inexistant. Elle correspond à une réaction cérébrale anticipant une menace qui n'existe pas (Béata *et al.* 2016). Il s'agit en quelque sorte d'une peur sans objet.

D'un point de vue neurobiologique, l'anxiété est un mécanisme complexe impliquant plusieurs régions du cerveau (le cortex et la région subcorticale incluant le cortex préfrontal, l'amygdale, l'hippocampe et le thalamus), ainsi que plusieurs neurotransmetteurs, principalement la noradrénaline, l'acide gamma-aminobutyrique (GABA) et la sérotonine. La dopamine joue aussi un rôle dans l'anticipation émotionnelle et l'hypervigilance.

Chez le Chat, la cystite idiopathique féline est soupçonnée d'être en rapport avec l'anxiété. Il s'agit d'un trouble du bas appareil urinaire avec hématurie, strangurie, pollakiurie, malpropreté et douleur abdominale. Cet état serait lié à une inflammation de la vessie d'origine neurogénique liée à une réponse inadaptée au stress (Buffington *et al.* 1996), *via* le système nerveux sympathique (Lavelle *et al.* 2000, Westropp *et al.* 2003, Westropp *et al.* 2006, Westropp *et al.* 2007, Wu *et al.* 2011). Le diagnostic résulte souvent de l'exclusion d'autres affections du bas appareil urinaire (absence de calculs, de bactéries...) et est souvent confirmé par une amélioration clinique liée à l'enrichissement de l'environnement. Chez le Chat, ce syndrome représente plus de 50% des troubles du bas appareil urinaire félin (Buffington *et al.* 1996).

Le CES ALAN rappelle que la thérapie comportementale reste la clé du traitement des troubles du comportement.

3.1.1.2. *Evaluation comportementale de l'anxiété*

L'évaluation des troubles n'est pas aisée ; elle est basée sur des questionnaires ou sur la réponse à des tests de stimulation. Par exemple, en 2003, Hsu et Serpell ont développé et validé un test comportemental chez le Chien, appelé ultérieurement CBARQ (Canine Behavioral Assessment and Research Questionnaire). Il s'agit d'un questionnaire de 68 questions testant 11 items en relation avec le comportement. Ces 11 items sont les suivants :

1. l'agression envers les étrangers,
2. l'agression envers le propriétaire,

3. la peur des étrangers,
4. la peur non sociale (bruits, orages..),
5. la peur ou l'agression envers un autre chien,
6. les comportements liés à la séparation,
7. les comportements liés à l'attachement ou à l'attention,
8. la capacité à apprendre,
9. la poursuite,
10. l'excitabilité et
11. la sensibilité à la douleur.

Chaque comportement est doté d'un score de 0 (l'animal ne présente pas ce comportement), de 1 à 3 (comportement léger à modéré) ou de 4 (sévère). Ce questionnaire est à la fois un outil de classification, de recherche, ainsi qu'un moyen de diagnostic des troubles comportementaux. Pour étudier l'anxiété, 5 des 11 items étudiés sont utilisés, à savoir la peur des autres chiens, la peur des étrangers, les peurs non sociales, la sensibilité à la douleur et les comportements liés à la séparation (Packer *et al.* 2017). Dans ces travaux, l'évaluation de l'anxiété a été basée, d'un point de vue comportemental, sur des questionnaires complétés par les propriétaires.

3.1.1.3. Paramètres biologiques permettant l'évaluation de la réponse neurobiologique à l'anxiété et/ou au stress

Il est possible d'évaluer le stress et/ou l'anxiété en utilisant divers paramètres métaboliques, notamment le cortisol plasmatique, urinaire, salivaire et/ou fécal et la sérotonine sanguine. Ces paramètres doivent toutefois être interprétés au regard des troubles comportementaux observés.

- Le cortisol est sécrété par les glandes corticosurrénales à partir du cholestérol. Sa sécrétion dépend également de l'ACTH produite par l'hypophyse dans le cerveau. Cette hormone intervient dans l'adaptation au stress de l'organisme (*cf.* § 3.1.1.1). Sa sécrétion suit un rythme "circadien" ou "nyctéméral" fixe : chez les Mammifères, elle est maximale entre 6h et 8h du matin, puis décroît jusqu'au soir où elle est minimale. Dans le sang, il est possible de doser spécifiquement le cortisol libre (la fraction biologiquement active), dont le dosage constitue l'examen de base pour l'exploration des dysfonctionnements de la glande corticosurrénale, ou le cortisol total, lequel comprend la fraction libre active et la fraction liée principalement à la Cortisol-Binding Globuline (CBG).
Le dosage du cortisol urinaire libre permet de dépister une hypersécrétion de cortisol. Pour ce dosage, il convient de collecter les urines pendant 24 heures et de les conserver au frais. Les résultats du dosage permettent alors d'évaluer la quantité totale de cortisol produite par jour.
Il peut aussi être intéressant de déterminer le RCCU (rapport cortisol/créatinine urinaire). En effet, la créatinine est éliminée de façon constante au cours de la journée. Le taux de cortisol est alors rapporté à une valeur connue, ce qui permet l'exploitation du résultat indépendamment de la dilution des urines et donc de la diurèse.
Le cortisol peut être dosé dans la salive et les fèces, ce qui reste actuellement du domaine de la recherche.
- La sérotonine peut être dosée dans le sang total (prélèvement le plus approprié car elle est présente dans le plasma mais surtout dans les plaquettes en quantité importante), le plasma (pauvre ou riche en plaquettes), les urines et le liquide céphalorachidien (LCR). Le dosage dans le sang total est le plus intéressant car il intègre la sécrétion de sérotonine au cours de la durée de vie moyenne des plaquettes (9 jours) et permet donc d'en apprécier une éventuelle augmentation récente. Par ailleurs, il peut aussi être intéressant de doser le métabolite principal de la sérotonine (5-HIAA ou 5-hydroxy-indole acetic acid) dans les urines. Pour ce dosage, il convient, comme pour le cortisol,

de collecter les urines pendant 24 heures et de les conserver au frais. L'ensemble de ces dosages relèvent du domaine de la recherche.

Enfin, des paramètres plus compliqués à explorer, toujours du seul domaine de la recherche, peuvent aussi être utilisés. Par exemple, il est possible d'évaluer dans le cerveau des animaux l'index de fixation au récepteur 5-HT_{2A} en utilisant notamment des traceurs radioactifs tel le ¹²³I-5I-R91150 (Vermeire *et al.* 2009).

3.1.2. Tryptophane : apports et données métaboliques / généralités

3.1.2.1. **Apports en Trp**

Le tryptophane (Trp) est un des acides aminés (AA) indispensables chez le Chien et le Chat. Les aliments les plus riches en Trp sont surtout les aliments d'origine animale riches en protéines. Les apports recommandés pour le Chien et le Chat sont présentés dans les tableaux 1 et 2 (NRC 2006).

Tableau 1. Apports recommandés (AR) en tryptophane pour le chien (NRC 2006)

	Trp (min)	Trp (AR)
Chiot 4-14 semaines	0,45 g/Mcal* 1,8 g/kg MS	0,58 g/Mcal 2,3 g/kg MS
Chiot 14 semaines et plus	0,35 g/Mcal 1,4 g/kg MS	0,45 g/Mcal 1,8 g/kg MS
Chien adulte	0,28 g/Mcal 1,1 g/kg MS	0,35 g/Mcal 1,4 g/kg MS
Chienne gestation lactation		0,30 g/Mcal 1,2 g/kg MS

* g/Mcal aliment à 4000 kcal/kg de matière sèche (MS)

Tableau 2. Apports recommandés (AR) en tryptophane pour le chat (NRC 2006)

	Trp (min)	Trp (AR)
Chaton	0,33 g/Mcal* 1,3 g/kg MS	0,40 g/Mcal 1,6 g/kg MS
Chat adulte		0,33 g/Mcal 1,3 g/kg MS
Chatte gestation lactation		0,48 g/Mcal 1,9 g/kg MS

* g/Mcal aliment à 4000 kcal/kg MS

3.1.2.2. **Données métaboliques relatives au Trp**

Le Trp est notamment un précurseur d'un neurotransmetteur, la sérotonine (5-hydroxy-tryptamine, 5-HT). Après le passage de la barrière hémato-encéphalique, la première étape, qui est l'étape limitante, dans la synthèse de la sérotonine est l'hydroxylation du Trp en 5-hydroxy-Trp par l'enzyme Trp-hydroxylase. Cette étape est suivie par la décarboxylation du 5-hydroxy-Trp en sérotonine. Il est estimé que moins de 5% du Trp ingéré est métabolisé en sérotonine (Bosch *et al.* 2009).

Au niveau cérébral, le Trp est en compétition avec les autres AAN, pour un même transporteur. Le rapport des concentrations plasmatiques [Trp libre]/[AAN] participe donc au contrôle de l'entrée du Trp ou des autres AAN dans le système nerveux central. Ainsi, une augmentation du Trp libre favorise l'entrée de Trp dans le système nerveux central. Il peut donc être intéressant de

déterminer le rapport des concentrations plasmatiques [TrpL]/[AAN]. La biodisponibilité cérébrale du Trp peut être influencée par la composition du repas. En effet, la consommation de glucides augmente la concentration plasmatique en Trp au détriment des autres acides aminés neutres (AAN) (Ile, Leu, Val, Tyr, Met et Phe). Ceci est dû au fait que l'insuline, libérée dans l'organisme après la consommation de glucides, entraîne une entrée rapide des acides aminés dans les tissus, à l'exception du Trp. Ainsi, avec un régime riche en glucides, le Trp franchit plus facilement la barrière hémato-méningée et les concentrations de Trp et de 5-HT dans le cerveau augmentent. Cet effet sérotoninergique augmente donc avec l'index glycémique des aliments ingérés (Lyons *et al.* 1988). Il faudrait aussi tenir compte de la digestibilité du Trp en fonction des sources (ce qui n'est jamais envisagé), des modalités de transport sanguin des différents AA (qui peuvent engendrer des variations de la teneur en Trp libre, le Trp étant en partie transporté par l'albumine) et de leurs variations (présence d'acides gras libres - AGL, sécrétion d'insuline) pour pouvoir interpréter le rôle de la composition des aliments sur le ratio des concentrations plasmatiques Trp/AAN.

Ainsi, compte tenu des nombreux facteurs susceptibles d'influencer la biodisponibilité du Trp, une étude basée uniquement sur des indicateurs ne permettant de mesurer qu'un seul acide aminé et/ou un seul neuromédiateur n'est pas suffisante.

3.2. Analyse de l'argumentaire du pétitionnaire

3.2.1. Présentation du dossier

Dans un premier temps, le pétitionnaire présente le stress et l'anxiété chez le Chat et le Chien, puis les manifestations cliniques qui y sont liées. Le pétitionnaire définit le stress comme une réaction d'adaptation, au départ positive, aux changements de milieu, puis l'anxiété comme une réponse à une menace. A la lecture du dossier, stress et anxiété sont deux notions qui apparaissent assez semblables mais différentes dans leur intensité. Un chapitre est ensuite consacré au Trp, le suivant à l'alpha-casozépine, et enfin aux aliments complets faisant l'objet de la demande.

Pour combattre les manifestations liées au stress, le pétitionnaire propose un aliment complet à 12% d'humidité ayant, pour une teneur énergétique de 4 000 kcal/kg MS :

- du Trp à raison de minimum 2,2 g/kg d'aliment chez le Chien et 3,4 g/kg d'aliment chez le Chat. Cela représente donc 2,2 g/kg et 3,4 g/kg d'un aliment contenant 3 520 kcal EM/kg (4 000 x 0,88), soit 0,625 g de Trp/Mcal chez le Chien et 0,975 g de Trp/Mcal chez le Chat ;
- et un hydrolysate de protéines de lait contenant au minimum 1,8% de alpha-s1-Cn décapeptide (ou MPH-1,8) ou casozépine. Le pétitionnaire propose d'en ajouter au minimum 1,1 g/kg d'aliment chez le Chien et un minimum de 0,9 g/kg d'aliment chez le Chat soit, pour un aliment complet à 12% d'humidité, ayant une teneur énergétique de 4 000 kcal/kg MS, donc 3520 kcal EM/kg de matière brute (MB), un apport de respectivement 0,31 et 0,26 g/Mcal chez le Chien et le Chat.

L'examen des références bibliographiques montre qu'elles concernent dans l'ordre décroissant :

- des données théoriques ou fiches techniques relatives :
 - à l'alpha-casozépine (48 références),
 - au syndrome urologique félin (31 références),
 - aux troubles comportementaux dans diverses espèces (27 références),
- des données réglementaires ou des opinions scientifiques (14 références),
- des données sur le Trp et ses métabolites chez l'Homme ou en général (13 références),
- des données expérimentales sur l'alpha-casozépine (14 références),
- des essais concernant le Trp chez diverses espèces : 8 chez les animaux de compagnie, 1 chez le renard, 4 chez l'Homme et 1 chez le porc (13 références).

Le présent dossier n'apporte pas de nouvelles données sur l'alpha-casozépine par rapport aux deux précédents dossiers soumis à l'Anses, qui remettraient en cause les précédentes conclusions du CES ALAN. Pour rappel, ce dernier a conclu, dans l'avis du 7 décembre 2012, que « le dossier du pétitionnaire permet de montrer que l'apport de 15 mg/kg/j d'hydrolysat trypsique de l'alpha1-caséine contenant au moins 1,8% d'alpha-casozépine permet de réduire les troubles émotionnels de chiens souffrant d'anxiété chronique ».

Seuls deux articles concernent l'utilisation conjointe de l'alpha-casozépine et du Trp dans deux études respectivement menées chez le Chien et le Chat. Ces deux études ont été présentées dans l'avis du 6 janvier 2015, mais seul l'ajout de casozépine avait été pris en compte puisque la demande de création d'ONP portait alors uniquement sur l'HTCB. Elles seront ici réexaminées en tenant compte de l'ajout de Trp, nutriment cité dans les caractéristiques nutritionnelles essentielles de la présente demande d'ONP.

Le dossier fournit également des publications sur des effets d'un apport de Trp seul chez l'Homme et certaines espèces. Avant de répondre aux questions posées portant sur un apport conjoint d'alpha-casozépine et de Trp, le CES ALAN a analysé ces publications afin d'évaluer l'intérêt éventuel d'un tel apport dans le cadre de troubles liés au stress et/ou à l'anxiété chez le Chien et le Chat.

3.2.2. Etudes sur les effets comportementaux du Trp

3.2.2.1. Chez les espèces autres que chiens et chats

Le système sérotoninergique central est impliqué dans les états liés à la peur et à l'anxiété ainsi que dans la réponse au stress chez l'Homme (Chaouloff 1993, Graeff *et al.* 1996). La supplémentation en Trp a été étudiée pour réduire les états liés à l'anxiété chez l'Homme (Cleare et Bond 1995, Murphy *et al.* 2006).

Chez l'Homme, dans une étude témoin-placebo de 98 sujets, les sujets recevant un complément de 1 g de Trp/jour ont rapporté moins d'agressivité uniquement si le complément était ingéré après la période témoin, ce qui suggère un possible effet placebo (Moskowitz *et al.* 2001).

Chez le Rat, un aliment enrichi en alpha-lactalbumine (et par conséquent riche en Trp), comparé à un aliment témoin enrichi en caséine, a induit une augmentation significative des concentrations basales et postprandiales en 5-HT au niveau hypothalamique. Cet effet associé à des modifications comportementales des animaux suggère un effet de type anxiolytique (Orosco *et al.* 2004).

Chez le Porc, au sevrage, un supplément de Trp (5 g/kg de MB d'aliment) a augmenté l'activité sérotoninergique hypothalamique, réduit le cortisol salivaire, amélioré la morphologie intestinale en augmentant le ratio cryptes/villosités et réduit l'activité physique 10 jours après l'introduction du supplément. Les auteurs ont conclu notamment que les régimes à teneur élevée en Trp amélioreraient les composants neuroendocriniens liés au stress ; aucun effet sur la réactivité comportementale n'a été rapporté (Koopmans *et al.* 2004).

Chez le Renard argenté élevé pour la production de fourrure, une étude zootechnique a démontré que l'ajout de Trp (1,2 g/Mcal) avait eu un effet significatif sur la pousse de la fourrure et le comportement, mais uniquement chez les femelles. Chez ces dernières, la familiarisation semblait améliorée suite à une diminution du temps de latence lors de la mise en présence de nouveaux objets dans l'environnement (Rouvinen *et al.* 1999).

3.2.2.2. Chez le Chien

Le pétitionnaire présente 4 études traitant de l'ajout de Trp seul (Bosch *et al.* 2009, DeNapoli *et al.* 2000, Pereira *et al.* 2010, Anzola *et al.* 2013).

- DeNapoli *et al.* (2000) ont étudié les effets du niveau protéique (18% - faible, ou 30% - élevé) et l'apport de Trp (chaque niveau de protéines étant supplémenté ou non, la teneur en Trp variant de 0,48 à 1 g/Mcal) dans l'aliment sur trois groupes de chiens présentant

de l'agression de dominance, de l'agression territoriale et de l'hyperactivité. Les auteurs recommandent de donner un régime à faible teneur en protéines supplémenté en Trp aux chiens présentant de l'agression de dominance ou de l'agression territoriale. Aucune différence n'a été notée pour les concentrations sériques en Trp et sérotonine, ni pour l'hyperactivité.

- L'étude de Bosch *et al.* (2009) relative à une supplémentation d'aliments en Trp distribués à des chiens modérément anxieux ne montre aucun effet de cette supplémentation sur le comportement. Les auteurs de l'étude doutent fortement de l'effet bénéfique d'un supplément de Trp sur les troubles liés à l'anxiété ou au stress, tout en soulignant qu'aucun des chiens enrôlés ne souffrait de troubles comportementaux sérieux. Les trois niveaux de Trp testés sont quasiment égaux (0,6 g/Mcal Trp) ou supérieurs (1,22 et 1,65 g/Mcal) à la demande du pétitionnaire (0,625 g/Mcal).
- L'étude de Pereira *et al.* 2010 est un résumé qui fait état « d'amélioration de certains signes d'anxiété » chez des chiens vivant en chenil. Un supplément de Trp est administré mais en l'absence de données sur les animaux (alimentation de base, poids corporel), il est impossible de calculer la dose journalière totale de Trp et de comparer les données aux quantités de Trp proposées par le pétitionnaire.
- Dans l'étude d'Anzola *et al.* (2013), les régimes de base ne sont pas isoénergétiques, les apports en Trp sont estimés à 2 et 4,2 g Trp/Mcal, donc de loin supérieurs à la demande du pétitionnaire.

Ces études relatives au seul ajout de Trp chez le chien sont peu comparables et ne permettent pas de conclure quant à la quantité de Trp à apporter pour avoir un effet. Dans ces études, il existe de grandes divergences entre les aliments (et, par conséquent, entre les teneurs en protéines et Trp, voire les ratio Trp/NAA) et les protocoles.

3.2.2.3. Chez le chat

Deux études sont rapportées par le pétitionnaire.

- Selon Trulson *et al.* (1985), le niveau de Trp alimentaire n'affecte pas l'activité fonctionnelle des neurones sérotoninergiques ; trois niveaux de Trp sont testés mais ils ne sont pas précisés.
- L'étude de Pereira *et al.* (2010) est publiée sous forme de résumé présentant une supplémentation chez des chats d'intérieur qui bénéficieraient « d'améliorations de certains signes d'anxiété ». Les apports totaux en Trp ne sont pas connus, mais l'apport du supplément peut être estimé à environ 0,06 g/Mcal, ce qui est faible.

3.3. Réponses aux questions posées

3.3.1. Un aliment pour animaux familiers ayant les caractéristiques suivantes (pour un aliment complet à 12 % d'humidité, ayant une teneur énergétique de 4 000 kcal/kg de matière sèche :

- un taux de tryptophane supérieur ou égal à 2,2 g/kg d'aliment complet ;
- un hydrolysate de protéines de lait contenant au moins 1,8 % d'alpha-S1-caséine et représentant au moins 1,1 g/kg d'aliment complet ;

permet-il d'atteindre l'objectif de soutien des systèmes neurobiologiques face aux troubles liés au stress et à l'anxiété chez les chiens ?

Une seule étude (Kato *et al.* 2012) associant les deux substances a été réalisée chez 28 chiens classés « anxieux » avec le questionnaire C-BARQ complété par leur propriétaire. Ces animaux n'étaient ni en thérapie comportementale, ni sous médication. Cette étude appelle plusieurs remarques :

- le protocole de l'étude est biaisé dans la mesure où le régime témoin a systématiquement été donné avant le régime étudié, ce qui peut influencer les résultats du RCCU et des tests comportementaux. Les auteurs admettent un possible effet placebo ;

- une diminution significative du RCCU est observée chez les chiens recevant le régime essai par rapport aux chiens recevant le régime témoin. Néanmoins, ce dosage isolé, sans autre dosage de neurotransmetteurs ou d'acides aminés chez les chiens, est insuffisant ;
- le choix du stress provoqué dans l'étude (une coupe d'ongles dans une clinique vétérinaire), constituant un stress aigu ponctuel n'apporte aucune donnée pour des situations d'anxiété.

Dans cette étude, les teneurs en Trp des deux régimes étaient un peu supérieures (2,83 vs 3,04 g/kg MS (ou 0,64 vs 0,72 g/Mcal), ce qui correspond pour le régime testé, à une augmentation de 12% dans la MS ou de 7% de l'énergie) à la teneur recommandée dans les caractéristiques nutritionnelles essentielles, si bien que cette étude ne démontre pas qu'un régime à 2,2 g de Trp/kg de MS peut répondre à l'objectif nutritionnel.

En outre, en l'absence de précision sur les quantités ingérées, il n'est pas certain que les chiens aient reçu des quantités significativement différentes de Trp.

Par conséquent, l'efficacité de l'ajout conjoint de Trp et de casozépine dans le cadre de l'ONP « soutien des systèmes neurobiologiques pour les troubles liés au stress et l'anxiété » chez le Chien n'est pas démontrée dans le dossier.

3.3.2. Un aliment pour animaux familiers ayant les caractéristiques suivantes (pour un aliment complet à 12 % d'humidité, ayant une teneur énergétique de 4 000 kcal/kg de matière sèche :

- un taux de tryptophane supérieur ou égal à 3,4 g/kg d'aliment complet ;
- un hydrolysat de protéines de lait contenant au moins 1,8 % d'alpha-S1-caséine et représentant au moins 0,9 g/kg d'aliment complet ;

permet-il d'atteindre l'objectif de soutien des systèmes neurobiologiques face aux troubles liés au stress et à l'anxiété chez les chats, y compris la cystite idiopathique féline ?

Dans une seule étude (Miyaji *et al.* 2015), 21 chats vivant strictement à l'intérieur ont été recrutés. Ils ont reçu, soit un régime témoin (n=11), soit un régime enrichi en casozépine et Trp durant 8 semaines ; le stress aigu consistait en une visite chez le vétérinaire et une prise de sang. Les résultats sont, pour les animaux recevant le régime enrichi, une augmentation significative du ratio plasmatique Trp/NAA, une diminution significative de la concentration en cortisol dans les urines et une absence d'effet sur la concentration plasmatique en cortisol.

Le CES note que :

- aucun effet comportemental n'a été mis en évidence dans cette étude de Miyaji. Un questionnaire aurait été réalisé, mais les données ne sont pas publiées ;
- les chats du groupe témoin de l'étude n'étaient pas diagnostiqués comme anxieux ;
- le stress généré était aigu avec une visite chez le vétérinaire ;
- le dosage du cortisol dans les urines a été réalisé à partir d'une prise d'urine ponctuelle et en aucun cas de la récolte des urines sur 24h comme cela est le standard afin d'estimer la quantité totale de cortisol produite par jour et par animal ;
- aucune diminution significative de la concentration plasmatique en cortisol total n'a été notée chez les chats ayant reçu un régime enrichi en casozépine et Trp durant 8 semaines ;
- l'apport en alpha-casozépine dans l'aliment testé est présenté comme étant de 15 mg/kg/j, ce qui est difficilement comparable à la teneur par kg d'aliment proposée par le pétitionnaire ;
- les apports de Trp dans les aliments étaient très proches, à savoir 3,4 et 3,6 g/kg de MS (soit une différence de 6%), mais cette différence disparaît quand les apports sont exprimés par Mcal EM, avec 1 g/Mcal pour chaque régime. Dès lors, en l'absence de données relatives aux ingestions journalières, il est impossible d'affirmer que les apports en

Trp ont été différents entre les 2 groupes d'animaux, si bien que cette étude ne permet pas d'affirmer que la teneur en Trp proposée par le pétitionnaire a eu des effets positifs par rapport à une ration correspondant aux apports recommandés. L'augmentation significative du ratio plasmatique Trp/NAA est inexplicée, les apports de Trp dans les deux régimes alimentaires étant quasi identiques.

Par conséquent, l'objectif de « soutien des systèmes neurobiologiques pour les troubles liés au stress et à l'anxiété, y compris la cystite idiopathique féline » chez les chats n'est pas démontré. En particulier aucune étude n'a été réalisée chez des chats présentant des symptômes de cystite idiopathique féline.

3.3.3. La durée d'utilisation indiquée (jusqu'à 6 mois initialement) est-elle pertinente et adaptée à l'ONP visé ?

La validité scientifique de l'ONP n'étant pas démontrée, cette question est sans objet.

3.3.4. Les autres dispositions prévues (l'animal devrait toujours avoir de l'eau à disposition) sont-elles pertinentes et adaptées à l'ONP visé ?

La validité scientifique de l'ONP n'étant pas démontrée, cette question est sans objet.

3.4. Conclusions du CES ALAN

L'analyse des trois dossiers (2012-SA-0176, 2014-SA-0151 et le présent dossier) visant la création d'un nouvel ONP relatif au stress et/ou à l'anxiété chez le Chien et le Chat conduit le CES ALAN aux conclusions suivantes :

- les données ne permettent pas d'affirmer que le stress et l'anxiété chez le Chien et le Chat relèvent du cadre d'une perturbation d'un processus d'assimilation, d'absorption ou de métabolisme ;
- l'apport d'un hydrolysate tryptique d'alpha1-caséine contenant au moins 1,8% d'alpha-casozépine seul a montré, à la dose de 15 mg/kg de poids corporel/j, une efficacité sur certains troubles émotionnels de chiens souffrant d'anxiété. Chez le Chat, des études complémentaires seraient nécessaires.
- aucune étude portant sur des animaux atteints de cystite idiopathique féline n'est présentée ;
- l'apport de tryptophane seul dans l'aliment n'a pas montré d'efficacité chez des chiens et chats présentant des troubles liés au stress et à l'anxiété. En outre, le pétitionnaire ne présente pas des essais réalisés avec des concentrations correspondant à celles qu'il recommande ;
- l'efficacité de l'ajout conjoint de casozépine et de tryptophane n'est démontrée ni chez le Chien ni chez le Chat présentant des troubles liés au stress et à l'anxiété.

4. ANALYSE ET CONCLUSIONS DE L'ANMV

4.1. Analyse

Le produit objet de la saisine est présenté comme un aliment complet sous forme de croquettes. La présentation du produit n'entraîne pas de doute sur sa classification en tant qu'aliment et ne fait pas une référence directe à un médicament vétérinaire. Néanmoins, l'allégation portée fait référence à une action curative sur une pathologie animale.

La présentation sous forme d'aliment complet en croquettes n'exclut pas non plus de le considérer comme un médicament vétérinaire. En effet, il existe des aliments comportant des allégations thérapeutiques qui sont des aliments médicamenteux définis à l'article 1° (6) de la directive n°2001/82/CE comme « *tout médicament vétérinaire constitué à partir d'un mélange d'aliment et*

de prémélange médicamenteux, présenté pour être administré aux animaux sans transformation en raison des propriétés curatives ou préventives du médicament (...) ».

La directive modifiée n°2001/82/CE du Parlement Européen et du Conseil instituant un code communautaire pour les médicaments vétérinaires définit ce qu'est un médicament vétérinaire :

- par présentation : « *a) toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies animales; ou* »
- par fonction : « *b) toute substance ou composition pouvant être utilisée chez l'animal ou pouvant lui être administrée en vue soit de restaurer, de corriger ou de modifier des fonctions physiologiques en exerçant une action pharmacologique, immunologique ou métabolique, soit d'établir un diagnostic médical* ».

Les troubles liés à l'anxiété comme rappelé dans les analyses et conclusions du CES ALAN interviennent chez l'animal à partir du moment où les comportements de peur (1) sont déclenchés par des stimuli inoffensifs ou (2) atteignent une intensité ou une fréquence plus élevées que ce qui serait attendu dans une situation spécifique ou (3) affectent la sécurité de l'animal, sa qualité de vie ou sa relation avec le propriétaire (Casey, 2005). Ces troubles de l'anxiété regroupent des signes divers comme les vocalisations (abolements, gémissements et autres), les destructions, les signes métaboliques ou neurovégétatifs (élimination, salivation, anorexie par exemple) et comportementaux (mouvement stéréotypés et troubles du sommeil par exemple). C'est pourquoi un animal présentant des troubles liés à l'anxiété est considéré comme souffrant d'une maladie (ou d'un état pathologique) et devra faire l'objet d'une consultation chez le vétérinaire, voire chez le vétérinaire comportementaliste.

A titre d'exemple, l'anxiété liée à la séparation avec les propriétaires chez le chien citée dans le dossier du pétitionnaire est une maladie classée en tant qu'autonomopathie ou maladie de l'attachement. Le suffixe -pathie issu du grec pathos est utilisé en médecine pour créer les désignations des maladies humaines ou animales.

Ces pathologies comportementales liées à l'anxiété sont prises en charge par une thérapie du comportement éventuellement associée à un traitement médicamenteux.

La jurisprudence européenne établit que la notion de « présentation » devait être entendue de manière **extensive**. L'objectif est en effet de « *préserver les consommateurs non seulement des médicaments nocifs ou toxiques en tant que tels, mais aussi de divers produits utilisés en lieu et place des remèdes adéquats* » (CJCE, 30 nov. 1983, aff. C-227/82, Van Bennekom). Par conséquent, un produit est « *présenté* » comme un médicament lorsqu'il est décrit ou recommandé comme tel, « *mais également chaque fois qu'il apparaît, de manière même implicite mais certaine, aux yeux d'un consommateur avisé, que ledit produit devrait - eu égard à sa présentation - avoir un effet curatif ou préventif* » (même arrêt).

4.2. Conclusions de l'ANMV

En l'absence d'élément scientifique sur la nécessité d'un soutien nutritionnel de la fonction neurobiologique lors de troubles liés à l'anxiété chez les chiens et chats, un aliment à ONP « *soutien de la fonction neurobiologique pour les troubles liés à l'anxiété* » dont l'effet attendu serait de diminuer l'expression des signes d'anxiété et des troubles comportementaux répond à la définition d'un médicament par présentation. En effet, un consommateur propriétaire d'un animal présentant des troubles de l'anxiété attendrait de ce produit un effet thérapeutique préventif à l'égard des troubles comportementaux dont souffre son animal.

5. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail endosse les conclusions du CES Alimentation animale et de l'ANMV relatives à une demande d'avis sur une modification des annexes de la directive 2008/38/CE de la Commission du 5 mars 2008 visant la création d'un nouvel objectif nutritionnel « *soutien du système neurobiologique pour les troubles liés au stress et à l'anxiété* » chez les chiens et les chats.

Dr Roger Genet

MOTS-CLES

Objectif nutritionnel particulier, chien, chat, alimentation animale, stress, anxiété, casozépine, tryptophane

Particular nutritional purpose, dog, cat, animal feed, stress, anxiety, caseozepin, tryptophan

BIBLIOGRAPHIE

Anses (2012) Avis du 7 décembre 2012 relatif à l'inscription d'un nouvel objectif nutritionnel particulier « atténuation des réactions au stress chez les chiens et chats » (saisine n°2012-SA-0167).

Anses (2015) Avis du 6 janvier 2015 relatif à une demande d'ajout à l'annexe de la directive 2008/38/CE de la Commission du 5 mars 2008 de l'objectif nutritionnel particulier « soutien des chiens et des chats faisant face à des réactions au stress, ce qui réduira les comportements associés » (saisine n°2014-SA-0151).

Anzola B, Ibáñez M, Morillas S, Benedetti R, Pérez J, Farías D (2013) The use of tryptophan in shelter anxiety dogs to treat stress-related disorders. *Revista Científica, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia* 23(1), 26-32.

Béata C, Muller G, Arpaillange-Vivier C, Graff E, Lachapèle D, Marion M, Marlois N, Massal N, Mège C (2016) Pathologie comportementale du chat. Afvac edt, Paris, France, 609 p.

Bosch G, Beerda B, Beynen AC, van der Borg JAM, van der Poel AFB, Hendriks WH (2009) A dietary tryptophan supplementation in privately owned mildly anxious dogs. *Appl Anim Behav Sci* 121, 197–205, doi.org/10.1016/j.applanim.2009.10.0030.

Buffington CA, Chew DJ, DiBartola SP (1996) Interstitial cystitis in cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 26, 317–326.

Chaouloff F (1993) Physiopharmacological interactions between stress hormones and central serotonergic systems. *Brain Res Rev* 18, 1-32.

Cleare AJ, Bond AJ (1995) The effect of tryptophan depletion and enhancement on subjective and behavioural aggression in normal male subjects. *Psychopharmacol* 118, 72-81.

DeNapoli JS, Dodman NH, Schuster L, Rand WM, Gross KL (2000) effect of dietary protein content and tryptophan supplementation on dominance aggression, territorial aggression and hyperactivity in dogs. *JAVMA* 217(4), 504-508.

Graeff FG, Guimaraes FS, De Andrade TGCS, Deakin JFW (1996) Role of 5-HT in stress, anxiety and depression. *Pharmacol Biochem Behav* 54(1), 129-141.

- Kato M, Miyaji K, Ohtani N, Ohta M (2012) Effects of prescription diet on dealing with stressful situations and performance of anxiety-related behaviors in privately owned anxious dogs. *J Vet Behav* 7, 21-26.
- Koopmans SJ, Guzik AC, van der Meulen J, Dekker R, Kogut J, Kerr BJ, Southern LL (2006) Effects of supplemental L-tryptophan on serotonin, cortisol, intestinal integrity, and behavior in weanling piglets. *J Anim Sci* 84, 963–971.
- Lavelle JP, Meyers SA, Giovani Ruiz W, Buffington CAT, Zeidel ML, Apodaca G (2000) Urothelial pathophysiological changes in feline interstitial cystitis: a human model. *Am J Physiol Renal* 278, F540-F553.
- Lyons PM, Truswell AS (1988) Serotonin precursor influenced by type of carbohydrate meal in healthy adults. *Am J Clin Nutr*. 47(3):433-9.
- Miyaji K, Kato M, Ohtani N, Ohta M (2015) Experimental Verification of the Effects on Normal Domestic Cats by Feeding Prescription Diet for Decreasing Stress. *J Appl Anim Welf Sci* 18, 355-362.
- Moskowitz DS, Pinard G, Zuroff DC, Annable L, Young SN (2001) The Effect of Tryptophan on Social Interaction in Everyday Life: A Placebo-Controlled Study. *Neuropsychopharmacol* 25(2), 277-289.
- Murphy SE, Longhitano C, Ayres RE, Cowen PJ, Harmer CJ (2006) Tryptophan supplementation induces a positive bias in the processing of emotional material in healthy female volunteers. *Psychopharmacol* 187, 121-130.
- Orosco M, Rouch C, Beslot F, Feurte S, Regnault A, Dauge V (2004) Alpha-lactalbumin-enriched diets enhance serotonin release and induce anxiolytic and rewarding effects in the rat. *Behav Brain Res* 148, 1-10.
- Packer RM, De Risio L, Volk HA (2017) Investigating the potential of the anti-epileptic drug imepitoin as a treatment for co-morbid anxiety in dogs with idiopathic epilepsy. *BMC Vet Res* 13(1), 90. doi: 10.1186/s12917-017-1000-0.
- Pereira GG, Fragoso S, Pires E (2010) Effect of dietary intake of L-tryptophan supplementation on working dogs demonstrating stress related behaviours. Presented at BSAVA, april 2010.
- Rouvinen K, Archbold S, Laffin S, Harri M (1999) Long-term effects of tryptophan on behavioural response and growing-furring performance in silver fox (*Vulpes vulpes*). *Appl Anim Behav Sci* 63, 65-77.
- Trulson ME (1985) Dietary tryptophan does not alter the function of brain serotonin neurons. *Life Sci* 37, 1067-1072.
- Vermeire ST, Audenaert KR, Dobbeleir AA, De Meester RH, De Vos FJ, Peremans KY (2009) Evaluation of the Brain 5-HT_{2A} Receptor Binding Index in Dogs with Anxiety Disorders, Measured with 123I-5I-R91150 and SPECT. *J Nucl Med* 50, 284–289.
- Westropp JL, Welk KA, Buffington CAT (2003) Small adrenal glands in cats with feline interstitial cystitis. *J Urol* 170, 2494-2497.
- Westropp JL, Kass PH, Buffington CAT (2006) Evaluation of the effects of stress in cats with idiopathic cystitis. *AJVR* 67(4), 731-736.
- Westropp JL, Kass PH, Buffington CAT (2007) *In vivo* evaluation of α 2-adrenoceptors in cats with idiopathic cystitis. *AJVR* 68(2), 203-207.
- Wu CH, Buffington CAT, Fraser MO, Westropp JL (2011) Urodynamic evaluation of female cats with idiopathic cystitis. *AJVR* 72(4), 578-582.