




Disponible en ligne sur
 ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

www.em-consulte.com



TRAVAIL ORIGINAL

L'impact des critères du élective *single embryo transfer* sur le taux de grossesses gémellaires dans la population française

Impact of elective single embryo transfer criterias on the twin pregnancy rate in a French population

F. Lamazou^{a,*,b,c}, E. Arbo^{a,d}, M. Grynberg^{a,b,c}, M.-C. Bourrier^a,
R. Fanchin^{a,b,c}, H. Fernandez^{a,b,c}, R. Frydman^{a,b,c}, N. Achour-Frydman^{b,c,e}

^a Service de gynécologie-obstétrique et médecine de la reproduction, hôpital Antoine-Béclère, AP-HP, 157, rue de la Porte-de-Trivaux, 92141 Clamart, France

^b Université Paris-Sud, 92140 Clamart, France

^c Inserm, U782, 92140 Clamart, France

^d Programa de Pós-graduação em Medicina, Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), Porto Alegre, Brésil

^e Service d'histologie-embryologie cytogénétique, hôpital Antoine-Béclère, AP-HP, 92141 Clamart, France

Reçu le 31 mars 2009 ; avis du comité de lecture le 15 novembre 2010 ; définitivement accepté le 18 novembre 2010

Disponible sur Internet le 23 décembre 2010

MOTS CLÉS

Eset ;
Grossesse
gémellaire ;
FIV ;
Qualité
embryonnaire ;
Critères
pronostiques ;
*Single embryo
transfer*

Résumé Afin de limiter les grossesses gémellaires et leur morbidité, des séries de propositions et de recommandations ont été faites afin de promouvoir le *elective single embryo transfer* (eSET) chez une population sélectionnée. Nous avons décidé d'appliquer les critères proposés dans cinq études de la littérature afin d'évaluer le pourcentage de notre population de FIV concernée et l'impact attendu sur nos taux de grossesses gémellaires.

Résultats.—Ces critères ne concernent que 2,4 à 10,8% de notre population et ne modifieront finalement que peu le taux de grossesses gémellaires avec une éventuelle perte de chance en termes de grossesse. Il convient alors de se tourner vers d'autres approches que les caractéristiques de la population pour diminuer le nombre d'embryons transférés.

© 2010 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : frederic.lamazou@abc.aphp.fr (F. Lamazou).

KEYWORDS

eSET;
Twin pregnancy;
IVF;
Embryo quality;
Prognosis factors;
Single embryo
transfer

Summary To reduce the twin pregnancy rate and their morbidity, several recommendations have been proposed to practice the "elective single embryo transfer" in a selected population. We decided to apply the criteria that were proposed in five articles from the literature to our population to evaluate the percentage of our population concerned and the impact on our twin pregnancy rate. The result is that these criteria only concern 2,4 to 10,8% of our population with a minor reduction of our twin pregnancy rate with a potential lake of chance concerning the pregnancy rate. We should study others possibilities than the population's criteria to reduce the number of embryo transferred.

© 2010 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Introduction

La procréation médicalement assistée (PMA) reste synonyme de taux élevés de grossesses multiples. En effet, le taux de grossesses gémellaires après fécondation in vitro était de 23 à 24 % en 2004 [1]. Aux États-Unis, ce taux atteint même les 35,4 % [2]. Les taux élevés de morbidité et de mortalité liés à ces grossesses multiples sont bien connus avec une mortalité maternelle multipliée par trois [3], une mortalité périnatale multipliée par 1,3 [4], des admissions en réanimation néonatale multipliées par trois [5,6], une mortalité néonatale multipliée par six [5,7] et un taux de prématurité (inférieur à 37 SA) de 43,7 % [5,7].

Ces complications liées aux grossesses gémellaires ont conduit à l'apparition de multiples recommandations, voire même de lois sur le transfert embryonnaire afin de réduire ce taux. Toutes ces recommandations incluent le transfert de l'embryon qui a les meilleures probabilités d'implantation et donc la limitation du nombre d'embryons à transférer. Ainsi, l'ESHRE [8], en 2002, a recommandé que le transfert d'un seul embryon soit proposé systématiquement aux patientes lors de leurs premiers et seconds cycles de fécondation in vitro. Ces recommandations sont déjà appliquées dans les pays Nordiques chez les femmes ayant un bon pronostic avec des taux de grossesse satisfaisants. Cette politique du eSET permettrait de réduire le taux de grossesses gémellaires de 25 à 5 % selon ces mêmes auteurs et serait applicable chez 23,6 [6] à 56 % des patientes [9], sans diminution des taux de grossesse.

Toutefois, pour obtenir des taux de grossesses identiques à ceux obtenus avec le transfert de deux embryons, cette stratégie ne peut concerner qu'une population de patientes sélectionnées de bon pronostic.

L'objectif de cette étude rétrospective est d'appliquer les critères du eSET proposés dans la littérature à la population consultant dans notre centre en vue d'une fécondation in vitro, afin d'évaluer le pourcentage de notre population éligible au eSET selon ces critères. Nous avons ensuite étudié la population de femmes ayant eu une grossesse gémellaire afin de les comparer aux critères sélectionnés.

Matériels et méthodes

Nous avons étudié rétrospectivement tous les cycles de FIV/ICSI réalisés dans le centre d'assistance médicale à la procréation de l'hôpital Antoine-Béclère entre le 1^{er} janvier 2006 et le 31 mars 2008. Pendant cette période,

1242 premiers cycles de FIV suivis d'une ponction d'ovocytes ont été réalisés.

Nous avons exclu, de notre analyse, tous les cycles annulés, les cycles spontanés et les patientes pour lesquelles des données étaient manquantes (14 patientes). Parmi ces patientes, nous avons sélectionné les 1075 patientes qui débutaient leur première tentative de FIV avec des données complètes.

Après une étude de la littérature, cinq études défendant l'eSET ont été sélectionnées : Thurin et al., 2004 [10], Martikainen et al., 2001 [11], Lukassen et al., 2005 [12], Veleva et al., 2006 [13] et Van Montfoort et al., 2004 [14]. Pour chacune de ces études, nous avons appliqué leurs critères d'inclusions à notre population sélectionnée afin de définir les groupes suivant :

- groupe A : critères de Thurin et al. [10] : femmes âgées de moins de 36 ans au moment du transfert embryonnaire, faisant leur première ou seconde tentative de FIV, avec au moins deux embryons de bonne qualité éligibles pour un transfert ou une cryoconservation. Les embryons de bonne qualité étaient décrits comme des embryons avec moins de 20 % de fragmentation et entre quatre et cinq cellules à j2, ou six à dix cellules à j3, ou blastocyste à j5 ou j6 ;
- groupe B : critères de Martikainen et al. [11] : femmes avec au moins quatre embryons de bonne qualité. Ces embryons sont définis comme ayant des blastomères de même taille et moins de 20 % de fragmentation à j2. L'âge n'a pas été pris en compte pour les deux patientes sur trois incluses dans l'étude, c'est pourquoi nous n'avons pas retenu ce critère ;
- groupe C : critères de Lukassen et al. [12] : patientes faisant leur premier cycle de FIV après une stimulation ovarienne accompagnée d'une bonne réponse ovarienne, âgées de moins de 35 ans, avec une FSH inférieure à 10 UI/l. Elles devaient avoir au moins deux embryons, dont au moins un d'excellente qualité (grade 4) ou bonne qualité (grade 3), avec 0 % ou moins de 10 % de fragmentation, sans tenir compte du nombre de blastomères. Pour remplir ces critères, nous avons étendu la sélection à 20 % de fragmentation, ce qui correspond au grade 3 de notre laboratoire ;
- groupe D : critères de Veleva et al. [13] : patientes ayant entre 36 et 39 ans avec au moins un embryon de top qualité défini comme ayant quatre blastomères à j4, avec moins de 20 % de fragmentation. Un second embryon éligible à la cryoconservation devait être obtenu ;

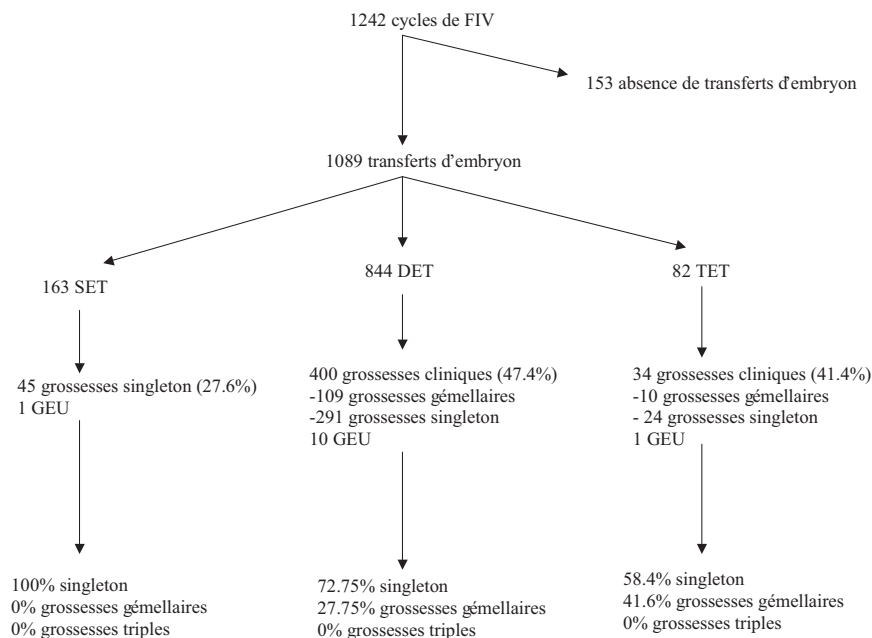


Figure 1 Issues des premiers cycles de FIV/ICSI entre janvier 2006 et mars 2008 dans notre centre.
Outcomes of the first cycles of IVF/ICSI between January, 2006 and March, 2008 in our center.

- **group E** : critères de Van Montfoort et al. [14] : patientes de moins de 38 ans au moment du transfert, quel que soit le nombre de cycles antérieurs, avec au moins deux ovocytes recueillis et au moins un embryon de bonne qualité défini comme ayant quatre à cinq blastomères à j2 et moins de 20 % de fragmentation.

Pour chaque groupe constitué, les critères d'études principaux étaient le pourcentage de notre population concernée et l'impact de cette population sur le taux de grossesses gémellaires. Nous avons également étudié les taux de grossesses cliniques et de grossesses multiples. Une grossesse clinique correspondait à une grossesse évolutive avec une activité cardiaque visible. Les embryons sont classés à j2 en fonction de leur morphologie :

- **grade A** : quatre cellules régulières sans fragments ;
- **grade B** : quatre cellules régulières avec moins de 10 % de fragments ;
- **grade C+** : embryons typiques avec trois à cinq cellules et une fragmentation inférieure à 30 % ;
- **grade C-** : embryons atypiques et/ou fragmentation supérieure à 30 % ;
- **grade D** : embryons avec plus de 50 % de fragments.

Étude statistique

Les données sont décrites en fréquence et en pourcentage (%). Afin de comparer le taux de grossesse global et de grossesses multiples avant et après sélection des différents groupes, nous avons utilisé le χ^2 test de Pearson et calculé l'*odds ratio* (95% IC). Le seuil de significativité statistique est atteint quand $p < 0,05$.

Les données ont été analysées avec le logiciel Stat View (version 5.0, Institute Inc., Cary, États-Unis).

Résultats

Pendant la période étudiée, 1242 cycles de FIV avec ponctions d'ovocytes ont été pratiqués. Mille quatre-vingt neuf transferts d'embryons ont été réalisés. Les détails des transferts et des issues sont résumés sur la Fig. 1.

Parmi les transferts d'embryons, 163 étaient des SET : une patiente a eu seulement un ovocyte mature après stimulation et 35 patientes n'ont eu qu'un seul embryon compatible avec un transfert. Dans les 127 cas restants, le transfert mono-embryonnaire a été décidé pour des indications médicales (petites dimensions de la cavité utérine, malformation utérine...) ou suite à une demande spécifique du couple. Le nombre d'embryons transférés était $1,78 \pm 0,54$. À la suite de ces transferts, nous avons obtenu 479 grossesses cliniques (43,9 % par transfert) dont 360 grossesses singleton (75,1 %) et 119 grossesses gémellaires (24,9 %). Aucune grossesse triple n'a été rapportée.

En appliquant les critères du SET prédéfinis, nous avons obtenu les groupes suivants :

- **groupe A** : critères de Thurin et al. : 97 patientes correspondaient à ces critères, ce qui correspond à 8,7 % de notre population. Parmi elles, deux n'ont pas eu de transfert d'embryon en raison d'un syndrome d'hyperstimulation ovarienne. Parmi ces patientes, une seule a eu un SET et 94 ont eu deux embryons de transférés. Le SET n'a pas abouti à une grossesse et le DET a permis d'obtenir 60 grossesses cliniques (63,8 % par transfert) et deux grossesses extra-utérines. Parmi ces grossesses, 39 (65 %) étaient des grossesses singleton et 21 (35 %) étaient des grossesses gémellaires. Les grossesses gémellaires de ce groupe représentaient 17,6 % de toutes nos grossesses gémellaires. Aussi, en supposant que ces patientes auraient été enceintes d'une grossesse

singleton après un eSET, le taux de nos grossesses géme-laires seraient alors estimé à 18,8% ;

- groupe B : critères de Martikainen et al. : 28 femmes regroupaient ces critères soit 2,6% de l'ensemble de nos patientes. Toutes ont eu un transfert de deux embryons permettant l'obtention de 19 grossesses cliniques (67,8% par transfert) dont 11 (52,9%) grossesses singleton et huit (42,1%) grossesses géme-laires. Ces grossesses géme-laires représentent 6,7% de l'ensemble de nos grossesses géme-laires. Aussi, en supposant que ces huit patientes auraient obtenues des grossesses singleton par le eSET, notre taux de grossesse géme-laire serait alors estimé à 21,4% ;
- groupe C : critères de Lukassen et al. : 81 patientes répon-daient à ces critères soit 7,5% de notre population en FIV. Deux de ces patientes n'ont pas eu de transfert en raison d'un syndrome d'hyperstimulation ovarienne. Les 79 autres femmes ont bénéficié d'un transfert de deux embryons, permettant l'obtention de 52 grossesses cliniques (65,8% par transfert) dont 33 (63,4%) single-ton et 19 (36,5%) grossesses géme-laires. Ces grossesses géme-laires représentent 15,9% de toutes nos grossesses géme-laires. Aussi, en supposant que ces 19 patientes auraient obtenues des grossesses singleton par l'eSET, notre taux de grossesses géme-laires serait alors estimé à 19,26% ;
- groupe D : critères de Veleva et al. : 26 patientes répon-daient à ces critères, soit 2,4% de notre population FIV. Toutes ces patientes ont eu deux embryons transférés, permettant l'obtention de 11 grossesses cliniques (42,3% par transfert) : quatre (36,4%) grossesses singleton et sept (63,6%) grossesses géme-laires. Ces grossesses géme-laires représentent 5,9% de l'ensemble de nos grossesses géme-laires. Aussi en supposant que toutes ces patientes auraient obtenu une grossesse singleton avec l'eSET, le taux de grossesse géme-laire serait alors estimé à 21,6% ;
- groupe E : critères de Van Montfoort et al. : 122 patientes répon-daient aux critères, soit 10,8% de notre popula-tion. Deux d'entre elles n'ont pas eu de transfert en raison d'un syndrome d'hyperstimulation ovarienne, tan-dis qu'une patiente a bénéficié du transfert d'un seul embryon aboutissant à une GEU. Parmi les 119 patientes ayant eu deux embryons, 77 grossesses cliniques ont été obtenue (64,7% par transfert) dont 48 (62,3%) gros-sesses singleton et 29 (37,6%) grossesses géme-laires. Ces grossesses géme-laires représentaient 24,3% de toutes nos grossesses géme-laires, aussi en supposant que ces 29 patientes auraient obtenues une grossesse singleton après un transfert mono-embryonnaire, le taux de gros-sesse géme-laire serait estimé à 17,3%.

Les femmes ayant eu des grossesses géme-laires dans notre programme de FIV au cours de cette période présen-taient les caractéristiques suivantes (Tableau 1).

Discussion

Bien qu'il soit toujours difficile d'appliquer des critères pro-venant d'études prospectives à une étude rétrospective, cette étude a le mérite de poser la question de la faisabilité du transfert mono-embryonnaire dans un centre d'AMP en

Tableau 1 Caractéristiques des femmes ayant eu une gros-sesse géme-laire après une FIV.

Characteristics of the women having had a twin-pregnancy after an IVF (in vitro fertilization).

| | Valeurs moyennes et écarts-types |
|-----------------------------------|----------------------------------|
| Âge maternel (années) | 33,35 ± 3,56 |
| BMI | 21,56 ± 5,83 |
| FSH (UI/L) | 6,08 ± 1,64 |
| AMH (ng/ml) | 5,66 ± 1,40 |
| Compte des follicules antraux (n) | 12,00 ± 1,07 |
| Embryon grade A transférés | 0,2 ± 0,045 |
| Embryon grade B transférés | 0,69 ± 0,07 |
| Embryon grade C+ transférés | 0,70 ± 0,07 |

France. La méthodologie de cette étude ne permet pas de mesurer à l'impact du transfert électif en perte de grossesse chez les couples qui ont obtenu une grossesse unique.

On peut constater que les critères ne concernent qu'une minorité de nos patientes (2,4 à 10,8% de notre population). Sur ces résultats, le critère qui sélectionne le plus notre population n'est pas l'âge mais la morphologie embryonnaire et la possibilité de congélation embryonnaire. Les critères de potentialité des embryons sont détaillés de façon succincte dans les différents articles que nous avons sélectionnés. Cette qualité est, en général, caractérisée par le nombre de blastomères le jour du transfert et le taux de fragmentation de ces cellules. Déterminer la potentialité des embryons reste une procédure subjective et opérateur dépendant. Le fait que nous ne retrouvons que de faibles taux d'embryons à fort potentiel implantatoire au sein des différents groupes sélectionnés, vient peut être de la sévérité de nos critères de classification de nos embryons.

La population de patientes ayant obtenu une grossesse géme-laire après FIV est, en effet, représentée par des femmes ayant initialement un bon pronostic avec un âge jeune (33,35 ± 3,56 ans), une bonne réserve ovarienne (AMH sérique à j3 du cycle : 5,66 ± 1,40 ng/ml et un compte des follicules antraux à j3 du cycle à 12,00 ± 1,07). Cependant, les embryons transférés n'étant pas des embryons à fort potentiel implantatoire sur la base de leur morphologie. Dans notre laboratoire, les embryons de qualité B sont caractérisés par quatre cellules de même taille à j2 avec moins de 20% de fragmentation et les C+ par soit six cellules de taille inhomogène et une fragmentation inférieure à 20%, soit par quatre cellules de même taille avec 30% de frag-mentation. Aussi, devant un couple ayant des embryons C+, leur transférer un seul embryon leur donne-t-il le maxi-mum de chance de grossesse? Le choix que nous avons fait dans notre centre est le transfert de deux embryons en acceptant le risque de grossesse géme-laire en sachant que dans plus de 75% des cas, une telle politique aboutit à une grossesse singleton en cas de grossesse. Nous ne disposons pas encore à l'heure actuelle de marqueurs fiables de la qualité embryonnaire prédictifs de l'implantation qui nous permettraient de sélectionner efficacement un embryon à transférer. De nouvelles perspectives ont été ouvertes grâce à la métabolomic et à l'exométabolomic. Ces techniques non invasives permettent d'évaluer la variation des milieux de

cultures des embryons (métabolomic) et des ovocytes (exo-métabolomic) grâce à des études spectrophotométriques [15]. Plusieurs marqueurs ont encore en cours d'évaluation [16,17], mais sembleraient pouvoir distinguer les embryons avec un bon pronostic d'implantation [18]. D'autres marqueurs de l'implantation comme l'AMH folliculaire [19,20] ou de la qualité embryonnaire comme le G-CSF [21] sont en cours d'évaluation et semblent prometteurs. De plus, ces marqueurs pourraient avoir une meilleure variabilité inter et intra-observateur que la morphologie embryonnaire [22]. Lorsque nous disposerons de tels marqueurs, il sera alors possible d'appliquer une politique de transfert mono-embryonnaire efficace en sélectionnant précisément l'embryon à transférer.

L'impact observé dans cette étude sur le taux de grossesse gémellaire semble, en effet, faible mais non négligeable puisqu'il serait possible d'obtenir une réduction de 6% (groupe B et D), à 16% (groupe C), 18% (groupe A), voire 24% (groupe E). Les critères utilisés par l'équipe de Van Montfoort et al. [14] seraient ceux qui permettraient de réduire le plus le taux de grossesses gémellaires, mais il ne suffirait pas à obtenir la réduction rapportée par dans la littérature, en particulier, par l'équipe de Gerris et al. [6] et Tiitinen et al. [9]. Le recours au transfert de trois embryons doivent également être réduits car comme même s'ils ne concernent que des patientes ayant un mauvais pronostic, ils sont à l'origine d'un taux de grossesse gémellaire de 41,6%.

Les grossesses gémellaires sont indéniablement associés à un risque accru de complications obstétricales et néonatales, mais il faut également prendre en compte les risques associés à la multiplication des cycles de FIV [23] : syndrome d'hyperstimulation ovarienne, grossesse extra-utérine, fausses couches spontanées, thromboemboliques et l'impact sur la psychologie du couple. La discussion sur le nombre d'embryons à transférer doit, par conséquent, être faite avec les couples en les informant les risques liés aux grossesses gémellaires mais aussi ceux associés à la politique du transfert mono-embryonnaire : échecs et répétitions des cycles de FIV et/ou de transfert.

Conclusion

Les critères du SET tels qu'ils sont définis actuellement ne semblent pas adaptés à la population ayant recours à la FIV dans notre centre. Il ne semble donc pas possible d'étendre cette politique pour passer de 23,6 à 56,1% de transfert mono-embryonnaire au sein de notre population, comme l'ont fait Gerris et al. et Tiitinen et al., puisque d'après cette étude, ces critères ne concernent que 2,4 à 10,8% de notre population. Toutefois, les critères proposés par Van Montfoort et al. couplés à l'arrêt des transferts de trois embryons pourraient avoir un impact bénéfique sur le taux de grossesse gémellaire, sans toutefois permettre de l'annuler. Mais une étude prospective randomisée est nécessaire pour confirmer ce point. Les méthodes non invasives permettant dévaluer le potentiel ovocytaire ou embryonnaire devraient permettre d'améliorer le choix des embryons et donc d'instaurer dans l'avenir une politique de transfert mono-embryonnaire efficace et adaptée à une population non sélectionnée.

Conflit d'intérêt

Aucun.

Références

- [1] Pouly JL, Larue L. (Fivnat2006) Are French results in assisted reproductive techniques so bad? *Gynecol Obstet Fertil* 2007;35:30–7.
- [2] Senat MV, Ancel PY, Bouvier-Colle MH, Bréart G. How does multiple pregnancy affect maternal mortality and morbidity? *Clin Obstet Gynecol* 1998;41:79–83.
- [3] Society for Assisted Reproductive Technology, American Society for Reproductive Medicine. Assisted reproductive technology in the United States: 2000 results generated from the American Society for Reproductive Medicine/Society for Assisted Reproductive Technology Registry. *Fertil Steril*; 2004;81:1207–20.
- [4] Daniel Y, Ochshorn Y, Fait G, Geva E, Bar-Am A, Lessing JB. Analysis of 104 twin pregnancies conceived with assisted reproductive technologies and 193 spontaneously conceived twin pregnancies. *Fertil Steril* 2000;74:683–9.
- [5] Bouvier-Colle MH, Varnoux N, Salanave B, Ancel PY, Bréart G. Case-control study of risk factors for obstetric patient's admission to intensive care units. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1997;79:173–7.
- [6] Gerris J, De Sutter P, De Neubourg D, Van Royen E, Vander Elst J, Mangelschots K, et al. A real-life prospective health economic study of elective single embryo transfer versus two-embryo transfer in first IVF/ICSI cycles. *Hum Reprod* 2004;19:917–23.
- [7] Lieberman B. An embryo too many? *Hum Reprod* 1998;13:2664–6.
- [8] Andersen AN, Goosesens V, Gianaroli L, Felberbaum R, De Mouzon J, Nygren KG. Assisted reproductive technology in Europe, 2003. Results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod* 2007;22:1513–25.
- [9] Tiitinen A, Unkila-Kallio L, Halttunen M, Hyden-Granskog C. Impact of elective single embryo transfer on the twin pregnancy rate. *Hum Reprod* 2003;18:1449–53.
- [10] Thurin A, Hausken J, Hillensjo T, Jablonowska B, Pinborg A, Strandell A, et al. Elective single-embryo transfer versus double-embryo transfer in in vitro fertilization. *N Engl J Med* 2004;351:2392–402.
- [11] Martikainen H, Tiitinen A, Tomas C, Tapanainen J, Orava M, Tuomivaara L, et al. One versus two embryos' transfer after IVF and ICSI: a randomized study. *Hum Reprod* 2001;16:1900–3.
- [12] Lukassen HG, Braat DD, Weltzels AM, Zielhuis GA, Adang EM, Scheenjes E, et al. Two cycles with single embryo transfer versus one cycle with double embryo transfer: a randomized controlled trial. *Hum Reprod* 2005;20:702–8.
- [13] Veleva Z, Vislksa S, Hyden-Granskog C, Tiitinen A, Tapanainen JS, Martikainen H. Elective single embryo transfer in women aged 36–39 years. *Hum Reprod* 2006;21:2098–102.
- [14] Van Montfoort AP, Fiddelers AA, Janssen JM, Derhaag JG, Dirksen CD, Dunselman GA, et al. In unselected patients, elective single embryo transfer prevents all multiples, but result in significantly lower pregnancy rates compared with double embryo transfer: a randomized controlled trial. *Hum Reprod* 2006;21:338–43.
- [15] Nagy ZP, Sakkas D, Behr B. Symposium: innovative techniques in human embryo viability assessment. Non-invasive assessment of embryo viability by metabolomic profiling of culture media (metabolomics). *Reprod Biomed Online* 2008;17:502–7.
- [16] Bromer JG, Seli E. Assessment of embryo viability in assisted reproductive technology: shortcomings of current approaches and the emerging role of metabolomics. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2008;20:234–41 [Review].

- [17] Baka S, Malamitsi-Puchner A. Novel follicular fluid factors influencing oocyte developmental potential in IVF: a review. *Reprod Biomed Online* 2006;12:500–6.
- [18] Botros L, Sakkas D, Seli E. Metabolomics and its application for non-invasive embryo assessment in IVF. *Mol Hum Reprod* 2008;14:679–90.
- [19] Takahashi C, Fujito A, Kazuka M, Sugiyama R, Ito H, Isaka K. Anti-Müllerian hormone substance from follicular fluid is positively associated with success in oocyte fertilization during in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2008;89:586–91.
- [20] Fanchin R, Mendez Lozano DH, Frydman N, Gougeon A, di Clemente N, Frydman R, et al. Anti-Müllerian hormone concentrations in the follicular fluid of the preovulatory follicle are predictive of the implantation potential of the ensuing embryo obtained by in vitro fertilization. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:1796–802.
- [21] Lédée N, Lombroso R, Lombardelli L, Selva J, Dubanchet S, Chaouat G, et al. Cytokines and chemokines in follicular fluids and potential of the corresponding embryo: the role of granulocyte colony-stimulating factor. *Hum Reprod* 2008;23:2001–9.
- [22] Paternot G, Devroe J, Debrock S, D’Hooghe TM, Spiessens C. Intra- and inter-observer analysis in the morphological assessment of early-stage embryos. *Reprod Biol Endocrinol* 2009;29(7):105.
- [23] Gleicher N, Barad D. The relative myth of elective single embryo transfer. *Hum Reprod* 2006;21:1337–44.