

La vitrification embryonnaire actuelle : techniques, stratégies et résultats attendus

The current embryo vitrification: techniques, strategies and results

Nathalie Sermondade^{1,2}

¹ Service de biologie de la reproduction, Cecos, hôpital Tenon, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris 20^e, France

² Centre de recherche Saint-Antoine Inserm - UMR S 938, hôpital Saint Antoine, Paris 12^e, France
<nathalie.sermondade@aphp.fr>

Résumé. La cryoconservation embryonnaire est devenu un élément incontournable dans la prise en charge des couples infertiles en assistance médicale à la procréation. L'essor de la vitrification, depuis les années 2010, a notamment permis une modification des stratégies thérapeutiques en s'appuyant sur une reproductibilité, une robustesse et une efficacité plus importantes que la congélation lente traditionnelle, et ce, à tous les stades embryonnaires. Cette technique peut même être utilisée pour différer les transferts d'embryons, avec des indications de plus en plus larges à cette stratégie dite de *freeze all*.

Mots clés : congélation embryonnaire, vitrification, freeze all, transfert différé

Abstract. Embryo cryopreservation has become an essential tool in Assisted Reproductive Technologies and management of infertile couples. The growth of vitrification since the 2010s has allowed a modification of therapeutic strategies based on greater reproducibility, robustness and effectiveness than traditional slow freezing, and this, at all embryonic stages. This technique can even be used to postpone embryo transfer, with increasing indications for this so-called "freeze all" strategy.

Key words: embryo cryopreservation, vitrification, freeze all

Depuis l'annonce, en 1972, de la survie d'embryons de souris après cryoconservation à -196 °C [1], la maîtrise de la cryoconservation embryonnaire a largement contribué au développement et à l'amélioration des résultats en assistance médicale à la procréation (AMP) chez l'homme. En effet, la cryoconservation des embryons surnuméraires permet d'offrir des chances supplémentaires de grossesse en cas d'échec du transfert frais, ou la poursuite du projet parental en cas de succès de ce dernier, conduisant à la notion de taux cumulés de naissances par cycle. Face aux risques liés aux grossesses multiples, y compris gémeillaires, la tendance actuelle est de privilégier l'obtention d'une grossesse unique grâce à un transfert embryonnaire unique (eSET, pour *elective single embryo transfer*). Pour garantir l'efficacité de cette stratégie, il est indispensable de pouvoir s'appuyer sur un programme de cryo-

conservation embryonnaire efficace, avec idéalement des taux d'implantation comparables entre les embryons congelés-décongelés et les embryons frais. La vitrification a permis de relever ce défi, et ce, à tous les stades embryonnaires. Cette technique peut aussi être utilisée pour différer les transferts d'embryons. Initialement réservée à des indications précises telles que la préservation de la fertilité ou une contre-indication formelle au transfert frais (risque de syndrome d'hyperstimulation ovarienne notamment), cette stratégie dite de *freeze all* s'est récemment largement développée.

Technique de vitrification

Les premières tentatives utilisant la vitrification comme méthode de cryoconservation embryonnaire ont été rapportées dans les années 1985, avec une première naissance mon-

Médecine
de la **Reproduction**

Tirés à part : N. Sermondade

diale après vitrification embryonnaire chez l'homme publiée en 1990 [2].

Principe général

Les objectifs fondamentaux pour garantir une cryoconservation efficace dans l'azote liquide à -196°C sont :

- interrompre le métabolisme de façon réversible,
- maintenir l'intégrité structurale et génétique,
- atteindre des taux de survie acceptables après décongélation,
- maintenir les compétences développementales après décongélation,
- bénéficier d'une technique fiable et reproductible.

Le principal inconvénient de la congélation est qu'elle peut entraîner une cristallisation de l'eau, à l'origine d'événements physiques et chimiques indésirables, susceptibles d'endommager les cellules cryoconservées. Le principe de la vitrification est d'éviter la formation de glace pendant le processus de refroidissement, en établissant un état vitreux, dans lequel les mouvements moléculaires sont ralentis ou interrompus, mais sans favoriser un réarrangement moléculaire ordonné. La vitrification correspond ainsi à la solidification d'une solution à basse température, par une élévation extrême de sa viscosité lors du refroidissement [3]. La probabilité de vitrification est directement liée à la viscosité du milieu, mais aussi à la vitesse de refroidissement. Des descentes en température ultrarapides sont obtenues par une plongée directe des échantillons dans l'azote liquide. Contrairement à la congélation lente, il n'y donc pas besoin d'appareil de congélation programmable.

Milieux de vitrification

L'utilisation de cryoprotecteurs est essentielle pour la cryoconservation de cellules. Il existe essentiellement deux groupes de cryoprotecteurs :

- pénétrants (glycérol, éthylène glycol et diméthylsulfoxyde [DMSO] notamment),
- non pénétrants (essentiellement sucres, mais aussi protéines et polymères).

Le ou les composants clés d'une solution de vitrification sont le ou les cryoprotecteurs pénétrants. Ceux-ci permettent d'abaisser le « point de congélation » de la solution, et, en diffusant rapidement hors des cellules, optimise la récupération du volume originel de la cellule lors du réchauffement, évitant ainsi les lésions par choc osmotique. Quant aux cryoprotecteurs non pénétrants, tels que les disaccharides (sucrose notamment), ils permettent une déshydratation cellulaire, contribuant à réduire le temps d'exposition des cellules aux cryoprotecteurs pénétrants. Lors de la décongélation, le sucrose agit

comme un tampon osmotique en réduisant la différence d'osmolarité entre les compartiments intra- et extracellulaires, afin de réduire la vitesse et l'ampleur du choc osmotique [4, 5].

Un inconvénient de la vitrification initialement souligné par certains embryologistes est l'utilisation de hautes concentrations de cryoprotecteurs, ce qui pouvait correspondre à une exposition des embryons à des solutions de vitrification potentiellement plus toxiques que celles utilisées pour la congélation lente conventionnelle. Néanmoins, les temps d'exposition aux cryoprotecteurs étant très courts, il a été démontré depuis que les concentrations intracellulaires sont finalement inférieures à celles observées en congélation lente [6].

Le protocole de vitrification embryonnaire le plus largement utilisé actuellement en France comprend l'exposition à une combinaison équimolaire d'éthylène glycol et de DMSO (7,5 % (v/v) chacun, puis 15 % (v/v)). Pour la dévitrification, il s'agit de solutions comprenant des concentrations décroissantes de sucrose (1 M puis 0,5 M). Ce protocole est utilisable quel que soit le stade embryonnaire (zygote, J2/3 et blastocyste), en dépit des rapports surface/volume avec des taux de refroidissement très différents entre ces stades.

Supports de vitrification

Un point clé dans la réussite de la vitrification repose sur la mise en place de l'embryon dans un très petit volume de milieu de vitrification, qui doit pouvoir être refroidi à une vitesse très élevée. Différents dispositifs ont été mis au point afin de répondre à ces contraintes, qui peuvent être classés en deux grands types : les systèmes ouverts et fermés.

Dans les systèmes dits « ouverts », la vitesse de refroidissement atteinte est de l'ordre de $20\,000^{\circ}\text{C}/\text{min}$, grâce à un contact direct de l'embryon avec l'azote liquide. Le principal intérêt de ces systèmes ouverts est la rapidité de descente en température. Cependant, un risque potentiel de contamination lors de la vitrification puis du stockage des échantillons a été soulevé, en raison du contact direct de celui-ci avec de l'azote liquide non stérile et également avec d'autres échantillons. Bien que restant extrêmement controversé, ce risque a conduit au développement de systèmes dits « fermés ». L'échantillon n'entre pas en contact direct avec l'azote liquide et une plus grande sécurité sanitaire est donc assurée. En revanche, la vitesse de refroidissement est plus faible, de l'ordre de $2\,000^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Aucune différence d'efficacité n'a été mise en évidence, en termes de taux de survie et de taux d'implantation, entre ces différents systèmes dans deux méta-analyses récentes [7, 8], justifiant l'utilisation très majoritaire des systèmes fermés en France.

Cas particulier du blastocyste : *to collapse or not to collapse* ?

Les blastocystes humains cultivés *in vitro* présentent des contractions partielles ou totales de leur cavité blastocœlique. Ces contractions peuvent être spontanées, mais elles peuvent aussi être associées à des procédures de FIV. En effet, les blastocystes humains expansés vont se contracter en réponse à tout changement physicochimique majeur dans leur environnement (chute de température, changement de milieu de culture, aspiration dans une pipette ou un cathéter, et *a fortiori* biopsie embryonnaire). Les cryoprotecteurs utilisés pour la congélation lente ou la vitrification des blastocystes provoquent également des modifications du volume du blastocœle [9]. La diminution de taille du blastocœle après exposition à un milieu de congélation peut être assez prononcée, la cavité atteignant un volume minimal en très peu de temps et le blastocyste précédemment expansé prenant une apparence collapsée. Certains auteurs ont proposé de faire s'effondrer artificiellement la cavité blastocœlique avant vitrification à l'aide de différentes techniques (notamment ponction à la micro-aiguille, impulsion laser entre deux cellules du trophoctoderme ou aspiration de fluide de blastocœle), rapportant, pour certains, une amélioration du taux de survie et une augmentation des taux d'implantation [10, 11]. Deux études prospectives randomisées ont plus récemment mis en évidence une amélioration des taux de survie après effondrement artificiel du blastocœle, mais sans effet significatif sur l'implantation [12, 13]. À ce jour, l'intérêt réel de ces techniques avant vitrification de blastocyste reste à confirmer.

Résultats attendus

Efficacité de la vitrification par rapport à la congélation lente

Plusieurs études randomisées contrôlées ou observationnelles se sont attachées à évaluer l'efficacité de la vitrification par rapport à la congélation lente. Dans une méta-analyse publiée en 2017, les résultats sont clairement en faveur de la technique de vitrification [14]. Celle-ci permet un taux de survie des embryons plus élevé que la congélation lente (risque relatif [RR] : 1,59 [1,30 ; 1,93] $p < 0,001$), la survie attendue passant de 60 % à 78-100 %. Les taux de grossesses cliniques par embryon transféré et de naissances vivantes par cycle sont plus élevés avec la vitrification qu'avec la congélation lente (RR : 1,51 [1,03 ; 2,23] $p = 0,036$ et RR : 2,28 [1,17 ; 4,44] $p = 0,016$, respectivement).

La vitrification a démontré son efficacité par rapport à la congélation lente au stade zygote [15], au stade J2/3 [16], mais surtout au stade blastocyste, avec des taux de naissances passant de 17,7 à 24,8 % par transfert [17].

Cette robustesse de la technique de vitrification permet de l'appliquer quel que soit le stade embryonnaire auquel est réalisé le transfert.

Enfin, ces résultats obtenus en vitrification embryonnaire ont des implications cliniques considérables, puisqu'ils contribuent largement à la possibilité de personnalisation de la prise en charge des couples en FIV.

Vitrification embryonnaire et taux cumulé de naissances vivantes

Les transferts d'embryons cryoconservés contribuent de manière substantielle au taux de réussite d'un cycle de FIV. Le taux cumulé de naissances vivantes est défini comme la probabilité d'avoir un enfant après l'utilisation de tous les embryons obtenus lors d'une tentative, impliquant ainsi le transfert d'embryons frais ainsi que de tous les embryons cryoconservés. On a estimé qu'en Europe, en 2011, la congélation embryonnaire a contribué au taux cumulé de naissances global à hauteur de 4 % (le taux de naissances passant de 19,7 % avec seulement les cycles frais à 24,0 % avec les transferts d'embryons congelés) [18]. Ces données reflètent probablement à la fois les améliorations des conditions de culture, les technologies de congélation et l'adoption d'une politique plus restrictive en matière de transfert embryonnaire (si moins d'embryons sont transférés dans des cycles frais, davantage sont disponibles pour la congélation).

Vitrification embryonnaire et développement du transfert embryonnaire unique

Le nombre d'embryons transférés lors du transfert frais dépend de nombreux facteurs cliniques, ainsi parfois que de considérations financières selon les modalités de remboursement ou non des tentatives, mais aussi de la qualité des programmes de congélation embryonnaire. Il est évident que pouvoir s'appuyer sur des protocoles robustes et reproductibles de cryoconservation est un prérequis essentiel pour promouvoir des politiques de transfert d'embryon unique. La vitrification a ainsi permis de combler l'écart entre embryons frais et cryoconservés, avec des taux d'implantation comparables [17].

Stratégie de *freeze all*

La stratégie dite de *freeze all* correspond à la congélation de l'ensemble de la cohorte embryonnaire. Elle est parfois appelée « transfert différé » ou « FIV en deux temps ». Initialement réduites à la préservation de la fertilité féminine, les indications se sont petit à petit élargies, jusqu'à la proposition, par certains auteurs, de réaliser un *freeze all* pour l'ensemble des tentatives.

Indications principales

Les indications du *freeze all* correspondaient principalement, au départ, à la congélation embryonnaire proposée dans le contexte de préservation de la fertilité féminine lorsque la femme était en couple. Elles se sont ensuite élargies aux situations suivantes :

- tentatives de FIV/ICSI couplées à un diagnostic préimplantatoire (en cas de pathologie monogénique ou chromosomique, ou pour dépistage des aneuploïdies embryonnaires), du fait des contraintes de temps liées aux analyses génétiques,
- risque de syndrome d’hyperstimulation ovarienne, *a fortiori* en cas de déclenchement par agoniste de la gonadolibérine (GnRH), du fait de la dangerosité de l’obtention d’une grossesse au cours de ce tableau clinique qui contre-indique généralement le transfert frais,
- endomètre non réceptif, soit constaté lors des échographies de monitoring (épaisseur insuffisante, aspect inadéquat ou présence d’un polype intracavitaire par exemple), soit lié à une élévation prématurée de la progestérone en fin de stimulation ovarienne (le seuil de celle-ci restant controversé).

Un transfert différé a également été proposé par certains auteurs en cas d’échecs d’implantation lors des transferts frais préalables. Après échec d’un premier cycle de FIV, une étude retrouve notamment des taux de naissance par transfert supérieurs en cas de *freeze all* par rapport à un transfert frais [19]. Ces résultats restent néanmoins à confirmer sur des effectifs plus importants.

Le *freeze all* pour tous ?

Certains auteurs ont également suggéré que la stratégie de *freeze all* pourrait, ou devrait, être appliquée à l’ensemble des tentatives, avec suppression totale des transferts frais.

Il est de plus en plus admis que le nombre d’ovocytes recueillis est un facteur clé de réussite pour l’obtention d’une naissance vivante lors d’une tentative de FIV, grâce à une augmentation du nombre cumulé d’embryons transférables. Sur plus de 400 000 cycles de FIV, Sunkara *et al.* ont ainsi noté des taux de naissances croissant avec le nombre d’ovocytes recueillis, atteignant un plateau pour plus de vingt ovocytes [20]. Ces données ont depuis été confirmées par plusieurs études [21, 22]. En revanche, la stimulation ovarienne avec l’hyperœstrogénie induite entraîne un risque de syndrome d’hyperstimulation ovarienne, parfois gravissime [23], et pouvant contre-indiquer le transfert frais, mais elle est également à l’origine d’une avance de maturation endométriale histologique [24] ainsi que de dérégulations génomiques au niveau de l’endomètre [25], qui peuvent compromettre la réussite d’un transfert frais, dans les jours qui suivent la ponction. Le concept de *freeze all*, proposé en 2009 par Shapiro *et al.*

[26], repose sur l’objectif de transférer l’embryon dans un environnement utérin favorable, en profitant des bénéfices de la stimulation en termes de nombre d’ovocytes recueillis et donc d’embryons disponibles, mais sans ses conséquences délétères sur la réceptivité endométriale. Devroey *et al.* ont formalisé ce concept en proposant une stratégie associant stimulation ovarienne par protocole antagoniste, déclenchement par agoniste de la GnRH, vitrification des embryons obtenus puis transfert de ceux-ci après décongélation sur un ou plusieurs cycles ultérieurs [27].

Malgré quelques controverses, cette stratégie a largement démontré son efficacité pour la réduction du risque de syndrome d’hyperstimulation ovarienne [28].

De nombreuses études ont évalué l’intérêt du *freeze all*, avec une certaine hétérogénéité des indications, rendant parfois leur comparaison difficile. Parmi celles-là, une étude contrôlée randomisée, incluant 2 157 femmes normo-ovulatoires de 20 à 35 ans lors de leur premier cycle de FIV avec transfert ou congélation à J2/3, n’a pas montré de supériorité au *freeze all* sur un transfert frais en termes de taux de naissances vivantes (48,7 % *versus* 50,2 %, lors du premier transfert congelé *versus* transfert frais) [29]. Une revue systématique avec méta-analyse s’est très récemment intéressée à ce sujet [28]. En agrégeant les résultats de onze études, correspondant à 5 379 femmes, les taux de naissances vivantes après *freeze all* ou transfert frais étaient comparables (RR : 1,07, IC95% : 0,99-1,17). Néanmoins, l’analyse en sous-groupes permet la mise en évidence d’une supériorité du *freeze all* pour les patientes hyperrépondeuses (définies comme quinze ovocytes ou plus lors de la ponction), contrairement aux patientes normorépondeuses (respectivement RR : 1,16, IC95% : 1,05-1,28 et RR : 1,03, IC95% : 0,91-1,17). Ces données ont été confirmées par une étude rapportant les résultats de plus de 82 000 cycles du registre de la Society for Assisted Reproductive Technology, mettant en évidence un intérêt du *freeze all* uniquement pour les patientes hyperrépondeuses [30].

Concernant les modalités pratiques de la stratégie de transfert différé, bien que ces résultats restent à confirmer, il semble que le stade embryonnaire de prédilection soit le blastocyste [31].

Conclusion et perspectives

La vitrification est une méthode de cryoconservation qui présente de nombreux avantages, notamment en termes d’efficacité. Après certaines résistances des professionnels, elle a finalement été adoptée par l’immense majorité des praticiens de FIV dans le monde. La vitrification embryonnaire permet des taux de survie excellents à tous les stades, puis des taux d’implantations et de naissances vivantes similaires à ceux des embryons

frais. Cette robustesse a permis de s'appuyer sur la congélation embryonnaire pour encourager le transfert embryonnaire unique, mais aussi pour développer de nouvelles stratégies de prise en charge en FIV telle que le *freeze all*.

A-t-on ainsi atteint un plateau d'efficacité des techniques de vitrification ? Certaines pistes sont proposées afin d'améliorer encore le processus. En particulier, les étapes de vitrification et de dévitrification reposent sur des techniques entièrement manuelles, et donc opérateur-dépendantes. Cette hétérogénéité de la pratique questionne sur un éventuel effet sur les résultats obtenus. Afin de minimiser la variabilité et de standardiser les étapes de vitrification, certains systèmes automatisés ont été développés [32]. Leur intérêt reste pour le moment à évaluer.

Enfin, la santé des enfants nés après AMP a toujours été une préoccupation majeure, *a fortiori* en cas d'utilisation de nouvelles technologies. La communauté médicale s'est donc interrogée sur les éventuels impacts des procédés de congélation/décongélation sur la santé des enfants, et l'introduction puis la généralisation de la vitrification embryonnaire a réactivé ces interrogations. Les données concernant la santé des enfants nés après congélation embryonnaire sont globalement rassurantes, quelle que soit la technique utilisée (congélation lente ou vitrification) [17, 33, 34], mettant même en évidence des issues périnatales meilleures pour le risque d'hypotrophie et de prématurité. Elles soulignent néanmoins un surrisque de macrosomie fœtale, pour l'instant mal expliqué et qui justifie de poursuivre la surveillance à long terme des enfants nés après transferts d'embryons congelés.

Liens d'intérêt : Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt en rapport avec cet article.

Références

- Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P. Survival of mouse embryos frozen to -196 degrees and -269 degrees C. *Science* 1972 ; 178 : 411-4.
- Gordts S, Roziers P, Campo R, Noto V. Survival and pregnancy outcome after ultrarapid freezing of human embryos. *Fertil Steril* 1990 ; 53 : 469-72.
- Fahy GM, MacFarlane DR, Angell CA, Meryman HT. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology* 1984 ; 21 : 407-26.
- Liebermann J, Dietl J, Vanderzwalmen P, Tucker MJ. Recent developments in human oocyte, embryo and blastocyst vitrification: where are we now? *Reprod Biomed Online* 2003 ; 7 : 623-33.
- Liebermann J, Tucker MJ. Effect of carrier system on the yield of human oocytes and embryos as assessed by survival and developmental potential after vitrification. *Reproduction* 2002 ; 124 : 483-9.
- Vanderzwalmen P, Connan D, Grobet L, et al. Lower intracellular concentration of cryoprotectants after vitrification than after slow freezing despite exposure to higher concentration of cryoprotectant solutions. *Hum Reprod* 2013 ; 28 : 2101-10.
- Cai H, Niringiyumukiza JD, Li Y, et al. Open versus closed vitrification system of human oocytes and embryos: a systematic review and meta-analysis of embryologic and clinical outcomes. *Reprod Biol Endocrinol* 2018 ; 16 : 123.
- Youm HS, Choi JR, Oh D, Rho YH. Closed versus open vitrification for human blastocyst cryopreservation: a meta-analysis. *Cryobiology* 2017 ; 77 : 64-70.
- Fehilly CB, Cohen J, Simons RF, Fishel SB, Edwards RG. Cryopreservation of cleaving embryos and expanded blastocysts in the human: a comparative study. *Fertil Steril* 1985 ; 44 : 638-44.
- Darwish E, Magdi Y. Artificial shrinkage of blastocoel using a laser pulse prior to vitrification improves clinical outcome. *J Assist Reprod Genet* 2016 ; 33 : 467-71.
- Iwayama H, Hoshi S, Yamashita M. *In vitro* and *in vivo* viability of human blastocysts collapsed by laser pulse or osmotic shock prior to vitrification. *J Assist Reprod Genet* 2011 ; 28 : 355-61.
- Gala A, Ferrieres A, Assou S, et al. Effects of artificial shrinkage prior to vitrification in a closed system: a randomized controlled trial. *Gynecol Obstet Fertil* 2014 ; 42 : 772-8.
- Van Landuyt L, Polyzos NP, De Munck N, Blockeel C, Van de Velde H, Verheyen G. A prospective randomized controlled trial investigating the effect of artificial shrinkage (collapse) on the implantation potential of vitrified blastocysts. *Hum Reprod* 2015 ; 30 : 2509-18.
- Rienzi L, Gracia C, Maggiulli R, et al. Oocyte, embryo and blastocyst cryopreservation in ART: systematic review and meta-analysis comparing slow-freezing versus vitrification to produce evidence for the development of global guidance. *Hum Reprod Update* 2017 ; 23 : 139-55.
- Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo SP. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod Biomed Online* 2005 ; 11 : 300-8.
- Debrock S, Peeraer K, Fernandez Gallardo E, De Neubourg D, Spiessens C, D'Hooghe TM. Vitrification of cleavage stage day 3 embryos results in higher live birth rates than conventional slow freezing: a RCT. *Hum Reprod* 2015 ; 30 : 1820-30.
- Li Z, Wang YA, Ledger W, Edgar DH, Sullivan EA. Clinical outcomes following cryopreservation of blastocysts by vitrification or slow freezing: a population-based cohort study. *Hum Reprod* 2014 ; 29 : 2794-801.
- European IVF-Monitoring Consortium (EIM). . Assisted reproductive technology in Europe, 2011: results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod* 2016 ; 31 : 233-48.
- Shapiro BS, Daneshmand ST, Restrepo H, Garner FC, Aguirre M, Hudson C. Matched-cohort comparison of single-embryo transfers in fresh and frozen-thawed embryo transfer cycles. *Fertil Steril* 2013 ; 99 : 389-92.
- Sunkara SK, Rittenberg V, Raine-Fenning N, Bhattacharya S, Zamora J, Coomarasamy A. Association between the number of eggs and live birth in IVF treatment: an analysis of 400 135 treatment cycles. *Hum Reprod* 2011 ; 26 : 1768-74.
- Polyzos NP, Drakopoulos P, Parra J, et al. Cumulative live birth rates according to the number of oocytes retrieved after the first ovarian stimulation for *in vitro* fertilization/intracytoplasmic sperm

injection: a multicenter multinational analysis including approximately 15,000 women. *Fertil Steril* 2018 ; 110 : 661-670 e661.

22. Zhu Q, Chen Q, Wang L, *et al.* Live birth rates in the first complete IVF cycle among 20 687 women using a freeze-all strategy. *Hum Reprod* 2018 ; 33 : 924-9.

23. Kawwass JF, Kissin DM, Kulkarni AD, *et al.* Safety of assisted reproductive technology in the United States, 2000-2011. *JAMA* 2015 ; 313 : 88-90.

24. Kolibianakis E, Bourgain C, Albano C, *et al.* Effect of ovarian stimulation with recombinant follicle-stimulating hormone, gonadotropin releasing hormone antagonists, and human chorionic gonadotropin on endometrial maturation on the day of oocyte pick-up. *Fertil Steril* 2002 ; 78 : 1025-9.

25. Horcajadas JA, Riesewijk A, Polman J, *et al.* Effect of controlled ovarian hyperstimulation in IVF on endometrial gene expression profiles. *Mol Hum Reprod* 2005 ; 11 : 195-205.

26. Shapiro BS, Daneshmand ST, Garner FC, Aguirre M, Hudson C, Thomas S. High ongoing pregnancy rates after deferred transfer through bipronuclear oocyte cryopreservation and post-thaw extended culture. *Fertil Steril* 2009 ; 92 : 1594-9.

27. Devroey P, Aboulghar M, Garcia-Velasco J, *et al.* Improving the patient's experience of IVF/ICSI: a proposal for an ovarian stimulation protocol with GnRH antagonist co-treatment. *Hum Reprod* 2009 ; 24 : 764-74.

28. Roque M, Haahr T, Geber S, Esteves SC, Humaidan P. Fresh versus elective frozen embryo transfer in IVF/ICSI cycles: a systematic

review and meta-analysis of reproductive outcomes. *Hum Reprod Update* 2019 ; 25 : 2-14.

29. Shi Y, Sun Y, Hao C, *et al.* Transfer of fresh versus frozen embryos in ovulatory women. *N Engl J Med* 2018 ; 378 : 126-36.

30. Acharya KS, Acharya CR, Bishop K, Harris B, Raburn D, Muasher SJ. Freezing of all embryos in in vitro fertilization is beneficial in high responders, but not intermediate and low responders: an analysis of 82,935 cycles from the Society for Assisted Reproductive Technology registry. *Fertil Steril* 2018 ; 110 : 880-7.

31. Zaca C, Bazzocchi A, Pennetta F, Bonu MA, Cotichio G, Borini A. Cumulative live birth rate in freeze-all cycles is comparable to that of a conventional embryo transfer policy at the cleavage stage but superior at the blastocyst stage. *Fertil Steril* 2018 ; 110 : 703-9.

32. Roy TK, Brandi S, Tappe NM, *et al.* Embryo vitrification using a novel semi-automated closed system yields in vitro outcomes equivalent to the manual Cryotop method. *Hum Reprod* 2014 ; 29 : 2431-8.

33. Ishihara O, Araki R, Kuwahara A, Itakura A, Saito H, Adamson GD. Impact of frozen-thawed single-blastocyst transfer on maternal and neonatal outcome: an analysis of 277,042 single-embryo transfer cycles from 2008 to 2010 in Japan. *Fertil Steril* 2014 ; 101 : 128-33.

34. Maheshwari A, Pandey S, Amalraj Raja E, Shetty A, Hamilton M, Bhattacharya S. Is frozen embryo transfer better for mothers and babies? Can cumulative meta-analysis provide a definitive answer? *Hum Reprod Update* 2018 ; 24 : 35-58.