

Vitrification embryonnaire et taux de succès cumulés : le débat entre transfert au stade cellulaire ou blastocyste est-il tranché ?

Embryo vitrification and cumulative success rates: is the debate closed between transfers at cleavage or blastocyst stage?

Philippe Terriou

Institut de médecine de la reproduction,
laboratoire Alphabio, clinique Bouchard,
Marseille, France
<pterriou@aol.com>

Résumé. Certains arguments physiologiques suggèrent que les transferts réalisés au stade blastocyste sont plus efficaces que ceux effectués au stade cellulaire. Cette revue de la littérature montre que si les tentatives de transfert de blastocystes sont en effet plus souvent suivies d'une grossesse après transfert frais, elles sont cependant plus souvent associées à une absence de transfert et surtout de vitrification embryonnaire, technique qui permet d'obtenir des grossesses supplémentaires. Au total, la différence n'est pas probante en termes de taux cumulés de grossesses ou de naissance par tentative. Il semble cependant que le transfert au stade blastocyste permette d'obtenir une grossesse plus rapidement. Sur le plan qualitatif, le transfert de blastocyste serait plus souvent accompagné de prématurité et de mortalité périnatale mais serait moins souvent associé à une grossesse ectopique.

Mots clés : vitrification, cellulaire, blastocyste, cumulé

Abstract. Several physiological arguments tend to assume that transfers of blastocysts are more efficient than transfer of embryos at cleavage stage. The present review of the literature shows that while cycles with blastocyst transfer are more often followed by a pregnancy after fresh transfer, they are however more often associated with a lack of transfer and embryo vitrification, a technic that allows to get additional pregnancies. In total, there is no convincing difference in terms of cumulative pregnancy rate or live birth rate per initial cycle. It seems however that blastocyst transfers allow to get a pregnancy more rapidly. In a qualitative point of view, blastocyst transfers seem to be more often associated with prematurity and perinatal mortality but seem to be less associated with ectopic pregnancy.

Key words: vitrification, cleavage, blastocyst, cumulative

En assistance médicale à la procréation (AMP) humaine, les embryons ont, jusqu'à la fin des années 1990, été transférés *in utero* 48 h (J2) ou 72 h (J3) après la ponction folliculaire. Le développement de nouveaux milieux de culture a ensuite permis de réaliser des transferts plus tardifs, au stade blastocyste (J5 ou J6) [1].

Plusieurs arguments plaident en faveur des transferts au stade blastocyste. Tout d'abord, physiologiquement, l'embryon humain ne rejoint la cavité utérine qu'à J4, au stade morula [2]. De plus, l'environnement nutritionnel de l'utérus étant différent de celui des trompes, un transfert au

stade cellulaire pourrait causer un stress délétère pour l'embryon et diminuer son potentiel implantatoire [3]. Par ailleurs, l'utérus serait plus contractile au moment du transfert au stade cellulaire, ce qui pourrait provoquer une expulsion d'embryons [4]. Il est aussi généralement postulé que les embryons se développant jusqu'au stade blastocyste sont les plus viables, en raison d'un phénomène d'auto-sélection. Enfin, même les classifications embryonnaires les plus efficaces utilisées au stade précoce ne permettent pas de prédire avec une certitude absolue quel embryon se développera jusqu'au stade blastocyste [5].

Médecine
de la **Reproduction**

Tirés à part : P. Terriou

Pour autant, si certaines équipes, se basant sur ces arguments pertinents, ne réalisent aujourd'hui que des transferts au stade blastocyste, d'autres s'interrogent sur sa supériorité, en termes de succès réellement observés dans le cadre d'une politique du « tout blastocyste ». En effet, l'obtention d'au moins un blastocyste n'est pas toujours au rendez-vous ; on peut alors se demander si un embryon obtenu à J2 qui a interrompu son développement avant d'atteindre le stade blastocyste ne se serait pas développé plus facilement *in utero* qu'*in vitro*, un incubateur étant probablement une moins bonne matrice que l'utérus. Cette question peut paraître particulièrement cruciale dans les cas les moins favorables, lorsque les ovocytes (et/ou les embryons qui en sont issus) sont rares et/ou de qualité médiocre.

Un autre paramètre vient encore complexifier le débat : la vitrification embryonnaire ayant permis d'obtenir de nets progrès, il est indispensable d'évaluer les chances supplémentaires qu'elle offre en termes de taux cumulés de grossesses – voire, mieux encore, de naissances vivantes – par ponction folliculaire initiale. Pour être parfaitement objectif, il serait nécessaire que toutes les études expriment leurs résultats en incluant l'issue de tous les transferts d'embryons congelés (TEC) réalisables après le transfert frais initial même si une grossesse ou une naissance a pu être obtenue après ce dernier.

Enfin, pour être totalement pertinent, on ne peut faire l'économie d'une évaluation des taux de succès en termes qualitatifs, c'est-à-dire en tenant compte de l'état de santé des enfants.

Les résultats en termes quantitatifs

Revue Cochrane

L'*evidence-based medicine* repose sur la revue Cochrane la plus récente de Glujovsky *et al.* [6], qui, parmi 741 enregistrements, ont retenu vingt-sept études randomisées prospectives incluant un total de 4 031 patientes. Parmi ces vingt-sept études, quinze concernaient des patientes de bon pronostic [7-21], trois des patientes de mauvais pronostic [22-24] et neuf de patientes non sélectionnées [25-33]. Malheureusement, treize études seulement rapportaient un taux de naissances vivantes, et cinq un taux cumulé de grossesses. Un autre facteur limitant de cette revue Cochrane est que la plupart des articles étudiés ne rapportaient une congélation des blastocystes qu'à J5 et pas à J6 (voire à J7), ce qui pourrait sous-estimer les taux de réussite cumulés dans le groupe blastocyste. Les résultats de cette revue ont été repris et résumés dans un article des mêmes auteurs, la même année, mais dans un autre journal [34].

Dans cette étude, le taux de naissances vivantes après transfert frais (*figure 1*) dans le groupe blastocyste était supérieur à celui du groupe des transferts au stade cellulaire (odds ratio [OR] = 1,48 ; intervalle de confiance [IC] = 1,20-1,82).

À l'inverse, deux observations venaient limiter ce bénéfice : une absence d'embryon à transférer (*figure 2*) était plus souvent observée dans le groupe blastocyste (OR = 2,50 ; IC = 1,76-3,55) et le taux de congélations par transfert (*figure 3*) y était inférieur (OR = 0,48 ; IC = 0,40-0,57).

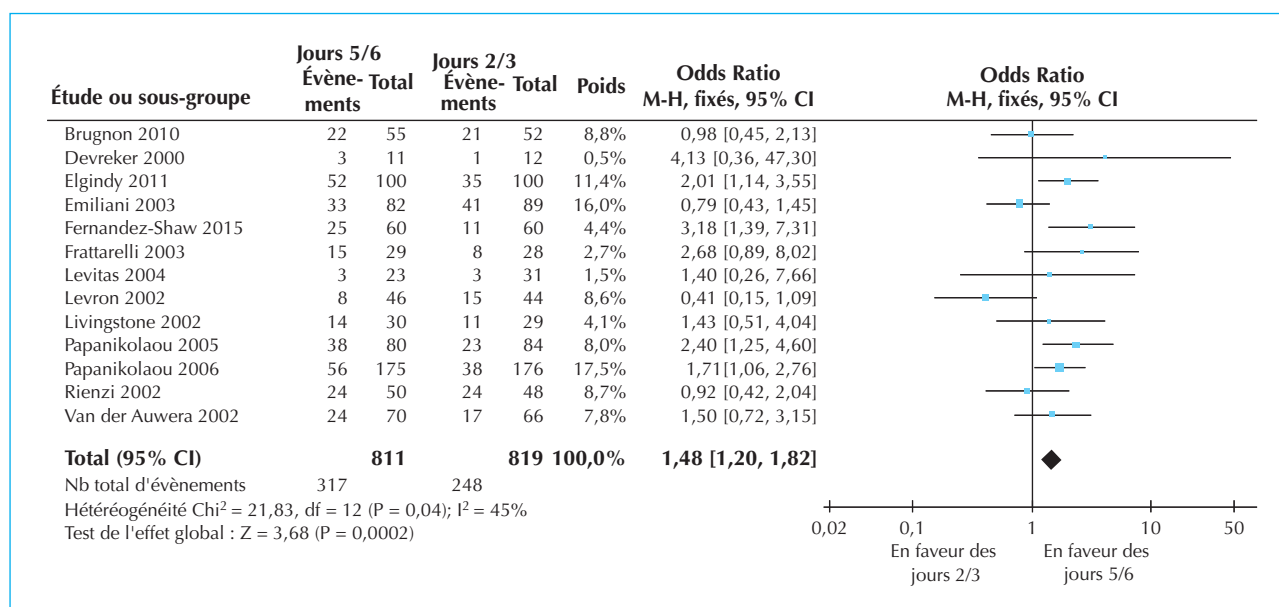


Figure 1. Taux de naissances vivantes après transferts frais réalisés aux stades cellulaire ou blastocyste [34].

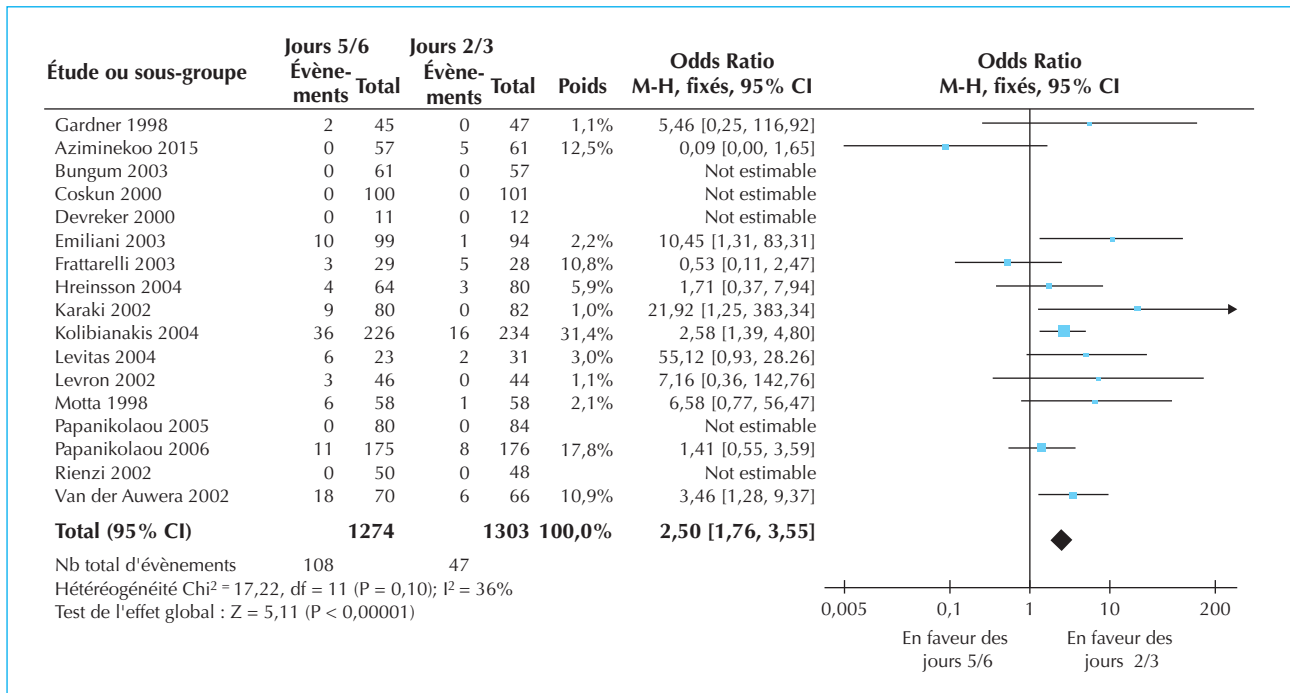


Figure 2. Échecs de transfert aux stades cellulaire et blastocyste [34].

Le taux de grossesses multiples n'était pas statistiquement significatif (OR = 1,05 ; IC = 0,83-1,33), ni celui de fausses couches (OR = 1,15 ; IC = 0,88-1,50).

Résultante des observations précédentes, le taux le plus pertinent, celui des grossesses cumulées tenant compte des grossesses obtenues après les éventuels TEC (figure 4)

n'était pas statistiquement significatif (OR = 0,89 ; IC = 0,64-1,22). Il est cependant intéressant de noter que cette revue Cochrane recouvrait les études réalisées durant la période où la congélation embryonnaire était réalisée selon la technique de congélation lente et celles menées par vitrification embryonnaire, plus efficace. Les auteurs

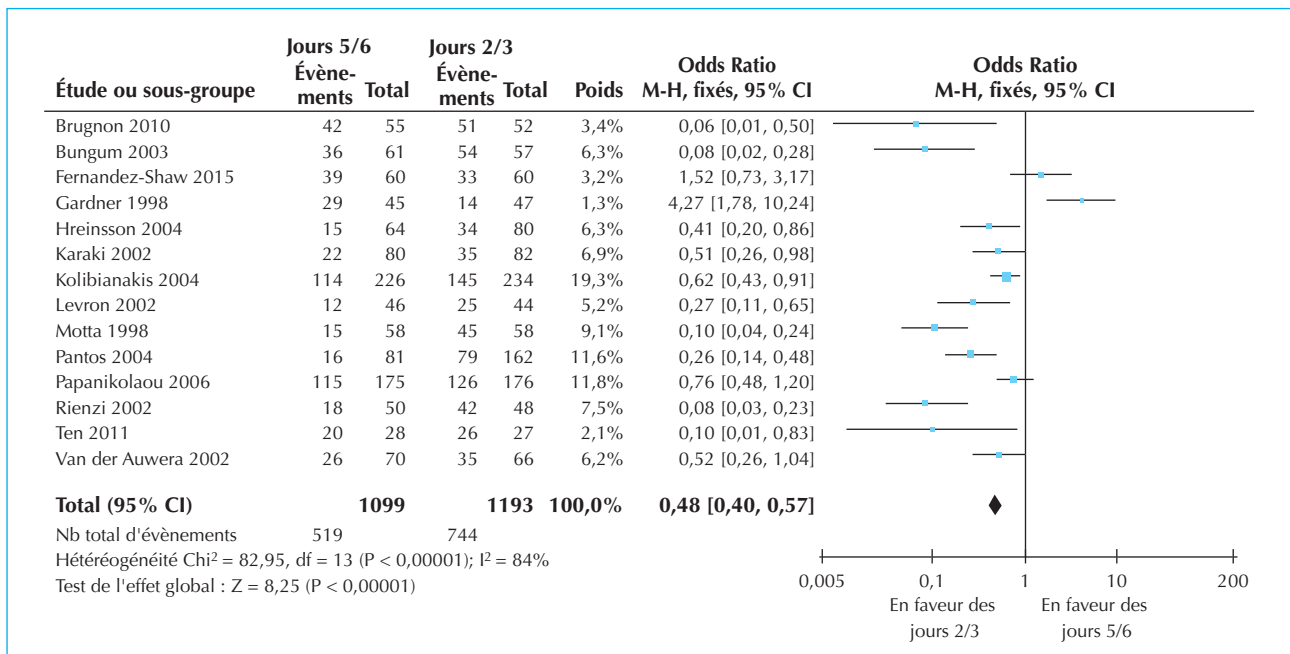


Figure 3. Taux de congélation embryonnaire aux stades cellulaire et blastocyste [34].

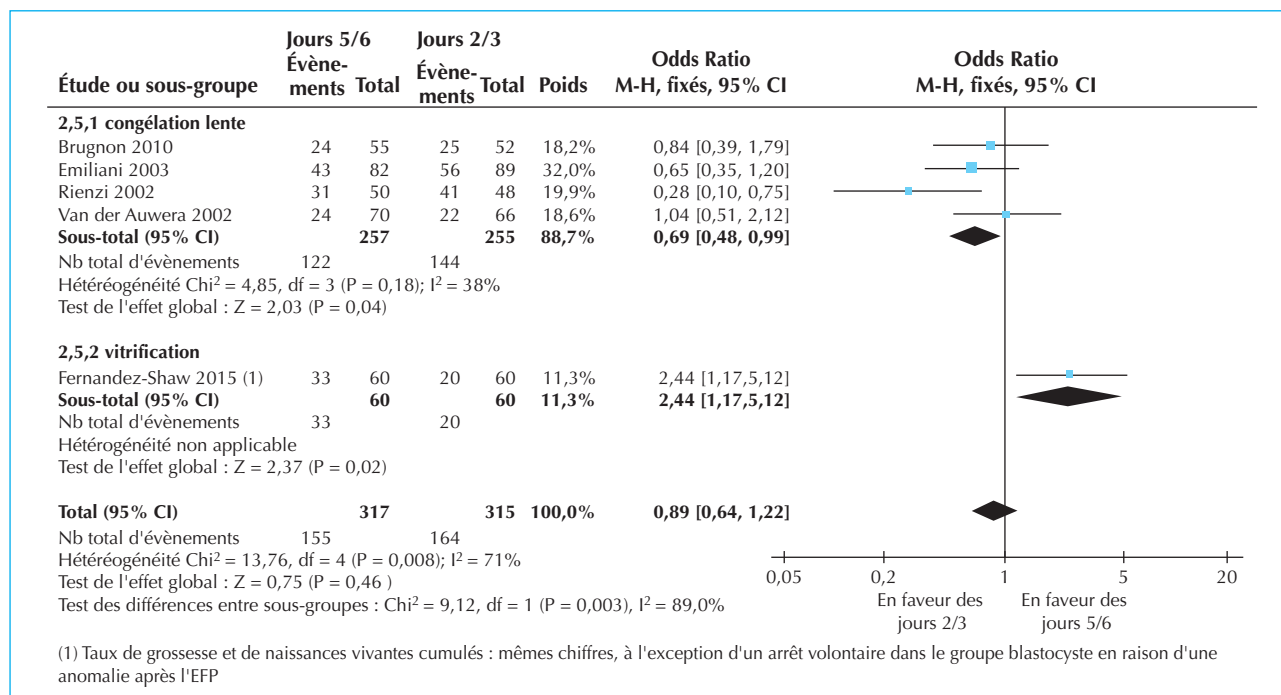


Figure 4. Taux de grossesses cumulés après transferts frais et congelés aux stades cellulaire et blastocyste [34].

ont donc distingué ces deux périodes pour étudier si l'introduction de la vitrification changeait le constat. Un seul article était dans ce cas [26], et il décrivait un avantage au stade blastocyste (OR = 2,44 ; IC = 1,17-5,12) ; ce travail a néanmoins une portée limitée, puisqu'il n'incluait que quarante-six patientes dans le groupe cellulaire et cinquante-huit dans le groupe blastocyste et qu'il s'agissait de patientes de bon pronostic ayant obtenu au moins quatre zygotes diploïdes.

À ce sujet, il faut rappeler que les critères d'inclusion et d'exclusion des études prises en compte dans cette revue Cochrane ne retenaient souvent que des patientes de bon pronostic, c'est-à-dire des femmes généralement jeunes et/ou chez qui un nombre minimum de follicules avaient été ponctionnés, ou chez qui un nombre minimum de zygotes ou d'embryons au stade cellulaire avaient été obtenus. À l'inverse, l'étude randomisée prospective d'Azimineko *et al.* [22] réalisée chez des patientes âgées de moins de 40 ans mais ayant eu au moins deux échecs d'implantation n'a rapporté aucune différence significative entre les stades cellulaire et blastocyste en termes d'implantation (22/152 = 14,5% versus 21/173 = 12,1%) ou de grossesses (19/57 = 33,3% versus 17/61 = 27,9%).

La littérature publiée après la revue Cochrane de 2016

La vitrification embryonnaire ayant permis d'améliorer nettement les résultats en termes de grossesses cumulées

et s'étant généralisée après 2016, il est intéressant de consulter quelques articles postérieurs à cette revue Cochrane, même s'il ne s'agit pas d'études randomisées prospectives.

L'équipe belge de l'hôpital universitaire (UZ) de Bruxelles a réalisé une étude rétrospective comparant les taux cumulés de naissances vivantes de 1 000 patientes âgées de moins de 36 ans en première tentative de fécondation *in vitro* avec ou sans injection intracytoplasmique de spermatozoïde [35]. Toutes les patientes étaient programmées à l'avance, à la fois pour un transfert sélectif et pour le jour du transfert (J3 : n = 377 ou J5 : n = 623) et ce, quel soit le nombre d'embryons obtenus à J3. Cependant les patientes à réponse trop faible ou trop forte (≤ 3 ou > 20 complexes cumulo-ovocytaires ponctionnés) étaient exclues de l'étude, de même que les cycles utilisant des spermatozoïdes non éjaculés du conjoint et les cycles avec diagnostic génétique préimplantatoire.

Le taux de naissances vivantes par cycle initié et transfert frais était supérieur dans le groupe blastocyste (37,8 versus 31,3 %, $p = 0,04$) et le nombre de transferts nécessaires pour obtenir un premier enfant né était inférieur dans ce même groupe ($p < 0,001$). Cependant, la variable la plus pertinente, le taux cumulé de naissances vivantes, s'élevait à 52,6 % dans le groupe cellulaire et à 52,5 % dans le groupe blastocyste. Il faut noter que les statistiques ne tenaient pas compte des embryons vitrifiés disponibles après la première naissance.

Une équipe chinoise [36] a réalisé une étude rétrospective sur 1 051 patientes dont les variables démographiques et cliniques ont été analysées et comparées (méta-analyse de données). Deux cent dix-sept (217) d'entre elles ayant bénéficié d'un transfert à J2/J3 ont ainsi été appariées à 217 autres qui avaient reçu un transfert à J5/J6. Le taux cumulé des grossesses s'est avéré non statistiquement significatif entre le groupe blastocyste et le groupe cellulaire (57,1 *versus* 53,5 %, OR = 1,16 ; 95% IC = 0,79-1,70) ; il en allait de même du taux de naissances vivantes (53,0 *versus* 49,8 % ; OR = 1,14 ; 95% IC = 0,78-1,66). Cependant, le nombre moyen de cycles par naissance vivante était significativement plus bas dans le groupe blastocyste. Les auteurs concluaient que les résultats globaux étaient comparables mais que la politique de transfert au stade blastocyste était plus efficace et moins coûteuse que celle au stade cellulaire.

Les résultats en termes qualitatifs

Prématurité, mortalité périnatale et poids de naissance

Si la culture prolongée jusqu'au stade blastocyste présente des avantages cliniques théoriques, elle pourrait, toujours sur un plan théorique, avoir d'éventuels effets délétères, dus à l'environnement *in vitro* que les embryons subissent pendant cette prolongation de culture. Dès lors, évaluer la qualité du conceptus devient nécessaire.

La méta-analyse de Martins *et al.* [37] a évalué des essais randomisés prospectifs, et retenu surtout douze études observationnelles rapportant les données périnatales de 195 325 singletons issus de transferts réalisés au stade blastocyste et au stade cellulaire. Les principaux résultats observés montrent une plus grande prématurité (< 37 semaines) dans le groupe blastocyste (OR = 1,12 ; 95% IC = 1,02-1,23), ainsi qu'une plus grande fréquence de grandes prématurités (< 32 semaines) (OR = 1,14 ; 95% IC = 1,04-1,24). La mortalité périnatale était également plus élevée dans ce groupe (OR = 1,48 ; 95% IC = 1,09-2,02).

Par ailleurs, le stade blastocyste était inversement corrélé à un petit poids de naissance par rapport au stade cellulaire (OR = 0,84 ; 95% IC = 0,75-0,94) et positivement à un gros poids de naissance (OR = 1,12 ; 95% IC = 1,03-1,21). Les auteurs ne proposaient pas de distinguer de sous-groupes « embryons frais seulement » et « embryons congelés seulement » pour évaluer l'éventuelle influence de la congélation sur ces deux paramètres.

Bien que cette méta-analyse ait permis d'obtenir des résultats statistiquement significatifs grâce à l'ampleur des populations étudiées, leurs auteurs précisaient que la nature observationnelle des articles étudiés et les imprécisions qui y étaient relevées, atténuaient la confiance qu'ils plaçaient dans leurs estimations. Des études plus

importantes et mieux conduites étaient donc, selon eux, nécessaires pour conclure définitivement.

Un an après cet article, Wang *et al.* [38] publièrent une autre méta-analyse confirmant ces résultats : un taux plus élevé de prématurité (< 37 semaines) était observé dans le groupe blastocyste (OR = 1,11 ; 95% IC = 1,01-1,22). Cependant, cette différence n'était pas observée pour les groupes « transferts frais et congelés » et le groupe « transferts congelés seuls » alors qu'elle l'était pour le groupe « transferts frais seulement » (OR = 1,16 ; 95% IC = 1,06-1,27). Le même constat était réalisé pour les prématurités < 32 semaines après « transferts frais seulement » (OR = 1,16 ; 95% IC = 1,02-1,31).

Comme pour la première méta-analyse, le groupe blastocyste était plus souvent associé à un gros poids de naissance (OR = 1,14 ; 95% IC = 1,04-1,25), mais les auteurs observaient une hétérogénéité notable et considéraient donc que le risque n'était pas réellement augmenté.

Ce groupe blastocyste était également moins souvent associé à un petit poids de naissance (OR = 0,83 ; 95% IC = 0,76-0,92). Dans le groupe « transferts frais seulement », les enfants issus d'un transfert de blastocyste présentaient un risque relatif de 0,83 (0,74-0,94) d'être petits pour leur âge gestationnel, avec une faible hétérogénéité des résultats ; dans le groupe « transferts congelés seulement », ce risque relatif était de 0,59 (0,32-1,06).

Les auteurs précisent, comme ceux de la première étude, que de nouveaux travaux sont nécessaires pour vérifier ces résultats.

Blastocyste et grossesse ectopique

Les arguments physiologiques suggérant qu'un transfert au stade blastocyste permettrait de diminuer le taux de grossesses ectopiques sont les suivants : les vagues de contractions utérines diminuant graduellement pendant la phase lutéale pour pratiquement s'arrêter sept jours après l'administration d'hormone chorionique gonadotrope (hCG) [39], transférer au stade tardif permettrait de diminuer les risques de remontée du blastocyste dans la trompe. Par ailleurs, le taux plus élevé d'œstrogènes observé au moment d'un transfert au stade cellulaire pourrait favoriser une implantation tubaire via un effet délétère de ces hormones sur la fréquence de battement des cils tubaires [40] et sur la sécrétion protéique tubaire [41].

La méta-analyse réalisée en 2017 par Zhang *et al.* [42] a retenu vingt-deux études de la littérature, à quoi s'ajoutait leur propre série, incluant un total de 143 643 grossesses (62 027 après transfert à J3 et 81 616 après transfert de blastocystes). Le taux de grossesses ectopiques était plus faible dans le groupe blastocyste (OR = 0,67 ; 95% IC = 0,54-0,85). Ces résultats étaient confirmés dans le

groupe des transferts frais (OR = 0,78 ; 95%IC = 0,69-0,88) et dans celui des transferts congelés (OR = 0,43 ; 95%IC = 0,36-0,51). Cependant, si ces différences étaient confirmées par les études observationnelles, elles ne l'étaient pas dans les essais randomisés prospectifs (OR = 0,86 ; 95%IC = 0,32-2,26).

L'étude du registre national du Royaume Uni [43] observait, sur un total de 153 115 grossesses, que la culture prolongée jusqu'à J3/4 ou J5/7 était corrélée à une diminution du pourcentage des grossesses ectopiques (respectivement : OR = 0,85 ; 95%IC = 0,76-0,94 et OR = 0,73 ; 95% IC = 0,63-0,84) par rapport aux transferts réalisés à J1/J2.

L'étude des registres cumulés d'Australie et de Nouvelle-Zélande [44] a observé quant à elle un taux de grossesses ectopiques plus élevé de 30 % dans le groupe des transferts frais effectués au stade cellulaire (OR = 1,30 ; 95%IC = 1,07-1,59).

Discussion

De nombreux arguments, basés sur la physiologie, tendent à faire préférer le transfert au stade blastocyste qu'aux stades cellulaires :

- le passage de l'embryon humain dans la cavité utérine ne s'effectue pas avant le stade morula [2],
- l'environnement nutritionnel de l'utérus est différent de celui des trompes [3],
- la contractilité de l'utérus est plus élevée [4],
- il existe une auto-sélection des embryons.

Concernant les résultats réellement observés [6, 35, 36], certains points semblent ressortir de la littérature de façon consensuelle :

- le taux de grossesses cliniques est plus élevé après transfert frais effectué au stade blastocyste,
- néanmoins, une absence d'embryon à transférer est plus souvent observée après culture prolongée jusqu'au stade blastocyste,
- et le taux de congélation embryonnaire par ponction folliculaire est plus élevé dans le groupe cellulaire,
- au total, les taux cumulés de grossesses après transfert frais et congelés sont comparables, semblant pour l'instant renvoyer les deux groupes dos à dos.

Si ces résultats ne font que confirmer l'impression que toutes les équipes ont au quotidien, ils ont le mérite de pouvoir asseoir cette intuition sur l'*evidence-based medicine*. On remarquera cependant que ces résultats reposent le plus souvent sur des études ayant opté pour la sélection de populations de bon pronostic, constituées de patientes jeunes et/ou de premières tentatives, et/ou en excluant des patientes présentant une altération de la réserve ovarienne ou une mauvaise réponse. Ces résultats

ne reflètent donc pas forcément nos réelles pratiques quotidiennes. À ce sujet, on peut d'ailleurs se demander si un embryon transféré précocement chez une femme présentant une altération de la réserve ovarienne ou une mauvaise réponse n'aurait pas plus de chances de poursuivre son développement *in utero* que dans un incubateur, matrice sans doute de moins bonne qualité que l'utérus en termes de conditions physicochimiques de culture, de facteurs de croissance ou d'autres oligoéléments présents naturellement dans l'utérus.

Il existe encore très peu d'études prospectives randomisées comparant les taux de grossesses cumulés après transferts frais et après tous les transferts congelés réalisés dans le cadre de la vitrification [26], technique plus récente et plus efficace que la congélation lente, plus largement étudiée dans la littérature. On constatera aussi qu'aucun article n'a étudié le devenir des embryons congelés/vitrifiés après obtention d'une première naissance, embryons qui doivent nécessairement être plus nombreux dans le groupe cellulaire.

L'Agence de la biomédecine (ABM) a publié en 2019 les premiers résultats français en termes de taux cumulés de naissances vivantes par ponction folliculaire initiale – le paramètre le plus pertinent pour répondre à notre question initiale. Étant donné la longueur de la prise en charge de ces patientes incluant des transferts répétés et la durée de la grossesse, ces données ne concernaient malheureusement que les résultats de l'année 2015, date à laquelle un certain nombre d'équipes utilisaient encore la congélation lente. Il ne fait aucun doute que le travail de l'ABM permettra bientôt (enfin) d'évaluer le bénéfice éventuel apporté par une politique « du tout blastocyste », puisqu'elle aura la possibilité de suivre le parcours complet des couples, y compris de ceux changeant d'équipe au cours de leur prise en charge.

Fait intéressant, il semble qu'un des bénéfices du transfert au stade blastocyste soit l'obtention plus rapide d'une naissance (taux de grossesse par transfert frais plus élevé et moins de transferts congelés répétés). Ce type de transfert serait donc plus efficace, moins coûteux et moins stressant.

Il se pourrait que l'ensemble de ces données changent avec l'avènement des appareils de type *time-lapse*. En effet, si ces systèmes permettent réellement de mieux prédire le potentiel implantatoire des embryons, et que cette prédiction est en faveur de l'un des deux types de transferts, les conclusions de ce débat en seront modifiées.

Enfin, si le transfert au stade blastocyste présentent d'éventuels bénéfices quantitatifs, ils ne doivent pas faire oublier qu'en termes qualitatifs, certains travaux [37, 38] ont montré que ce type de transfert pouvait être associé à un taux plus élevé de prématurité, de grande prématurité et de mortalité périnatale. On peut cependant remarquer que ces méta-analyses notaient elles-mêmes que les articles sélectionnés et étudiés présentaient des imprécisions et de

possibles biais, rendant toute conclusion définitive difficile à formuler. Enfin, et toujours dans le domaine qualitatif, on peut aussi remarquer que les transferts au stade blastocyste semblent associés à une diminution du taux de grossesses ectopiques [42-44], ce qui a conduit certaines équipes à proposer ce type de transfert chez des patientes ayant présenté plusieurs grossesses extra-utérines après AMP.

En conclusion, si on s'en tient à l'*evidence-based medicine*, le débat n'est pas définitivement tranché concernant le pour et le contre une politique du « tout-blastocyste ». De nouvelles études randomisées prospectives incluant un grand nombre de cas basés sur des populations non sélectionnées, utilisant la vitrification comme méthode de congélation embryonnaire et exprimant leurs résultats en termes de taux cumulés de naissances d'enfants en bonne santé par ponction initiale s'avèrent nécessaires pour y répondre objectivement. Idéalement, ces études seront basées sur des systèmes *time-lapse* – si ces derniers font la preuve d'une bonne prédictibilité du potentiel implantatoire des embryons transférés. Un certain espoir peut sans doute être mis dans le travail de l'ABM qui pourra peut-être répondre avec certitude à cette question complexe dans les années à venir.

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

Références

1. Jones GM, Trounson AO, Gardner DK, *et al.* Evolution of a protocol for successful blastocyst development and pregnancy. *Hum Reprod* 1998 ; 13 : 169-77.
2. Croxatto HB, Fuentaealba B, Diaz S, *et al.* A simple non-surgical technique to obtain unimplanted eggs from human uteri. *Am J Obst Gynecol* 1972 ; 112 : 662-8.
3. Gardner DK, Lane M, Calderon I, *et al.* Environment of the preimplantation human embryo *in vivo*: metabolite analysis of oviduct and uterine fluids and metabolism of cumulus cells. *Fertil Steril* 1996 ; 65 : 349-53.
4. Fanchin R, Picone O, Ayoubi JM, *et al.* Uterine contractility and reproduction: new perspectives. *J Gyn Obst Biol Reprod* 2002 ; 31 : 325-32.
5. Yu CH, Zhang RP, Li J, AZC. A predictive model for high-quality blastocyst based on blastomere number, fragmentation and symmetry. *J Assist Reprod Genet* 2018 ; 35 : 809-16.
6. Glujovsky D, Blake D, Farquhar C. Cleavage stage *versus* blastocyst stage embryo transfer in assisted reproductive technology. *Cochrane Database Syst Rev* 2016 ; 30(6) : CD002118.
7. Brugnon F, Bouraoui Z, Ouchchane L, *et al.* Cumulative pregnancy rate after single cleavage-stage *versus* blastocyst-stage transfer: a randomized and prospective study. *Hum Reprod* 2010 ; 25 : i60-1.
8. Bungum M, Bungum L, Humaidan P, *et al.* Day 3 *versus* day 5 embryo transfer: a prospective randomized study. *Reprod Biomed Online* 2003 ; 1 : 1947-52.
9. Coskun S, Hollanders J, Al-Hassan S, *et al.* Day 5 *versus* day 3 embryo transfer: a controlled randomized trial. *Hum Reprod* 2000 ; 15 : 1947-52.
10. Elgindy EA, Abou-Setta AM, Mostafa MI. Blastocyst-stage *versus* cleavage-stage embryo transfer in women with high oestradiol concentrations: randomized controlled trial. *Reprod Biomed Online* 2011 ; 23 : 789-98.
11. Fisch JD, Adamowicz M, Hackworth J, *et al.* Single embryo transfer (SET) day 3 *versus* day 5 based on graduated embryo score (GES) and soluble human leukocyte antigen-G (sHLA-G): preliminary results of a prospective, randomized controlled trial. *Fertil Steril* 2007 ; 88(Suppl 1) : 332-3.
12. Frattarelli JL, Leondires MP, McKeeby JL, *et al.* Blastocyst transfer decreases multiple pregnancy rates in vitro fertilization cycles: a randomized controlled trial. *Fertil Steril* 2003 ; 79 : 228-30.
13. Gardner DK, Schoolcraft WB, Wagley L, *et al.* A prospective randomized trial of blastocyst culture and transfer in *in vitro* fertilization. *Hum Reprod* 1998 ; 13(12) : 3434-40.
14. Hreinsson J, Rosenlund B, Fridstrom M, *et al.* Embryo transfer is equally effective at cleavage stage and blastocyst stage: a randomized prospective study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004 ; 117 : 194-200.
15. Kaur P, Swarankar ML, Maheshwari M, *et al.* A comparative study between cleavage stage embryo transfer at day 3 and blastocyst stage transfer at day 5 in *in vitro* fertilization/intra-cytoplasmic sperm injection on clinical pregnancy rates. *J Hum Reprod Sc* 2014 ; 7(3) : 194-7.
16. Levron J, Shulman A, Bider D, *et al.* A prospective randomized study comparing day 3 with blastocyst-stage embryo transfer. *Fertil Steril* 2002 ; 77 : 1300-1.
17. Livingstone M, Bowman M. Single blastocyst transfer: a prospective randomised trial. Proceedings of the 17th World Congress. *Fertil Steril* 2001 ; ; 218.
18. Papanikolaou EG, D'haeseleer E, Verheycn G, *et al.* Live birth rate is significantly higher after blastocyst transfer than after cleavage-stage transfer when at least four embryos are available on day 3 of culture. A randomized prospective study. *Hum Reprod* 2005 ; 20 : 3198-203.
19. Papanikolaou EG, Camus M, Kolibianakis EM, *et al.* *In vitro* fertilization with single blastocyst-stage *versus* cleavage-stage embryos. *New Engl J Med* 2006 ; 354 : 1139-46.
20. Rienzi I, Ubaldi F, Iacobelli M, *et al.* Day 3 embryo transfer with combined evaluation at the pronuclear and cleavage stages compares favourably with day 5 blastocyst transfer. *Hum Reprod* 2002 ; 17 : 1852-5.
21. Ten J, Carracedo MA, Guerrero J, Rodriguez-Arnedo A, Llacer J, Bernabeu R. Day 3 or day 5 embryo transfer?: A randomized prospective study. Proceedings of the 27th Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology. *Hum Reprod* 2011 ; ; i165.
22. Azimineko E, Mohseni Salehi MS, Kalantari V, *et al.* Pregnancy outcome after blastocyst stage transfer comparing to early cleavage stage embryo transfer. *Gyn Endocrinol* 2015 ; 31 : 880-4.
23. Devreker F, Delbaere A, Emiliani S *et al.* Prospective and randomized comparison between transfer on day 2 or day 5 for patients with more than four IVF attempts. Annual Meeting of the

European Society of Human Reproduction and Embryology. 2000 : P135.

24. Levitas E, Lunenfeld E, Hackmon-Ram R *et al.* A prospective, randomized study comparing blastocyst *versus* 48-72 h embryo transfer in women failed to conceive three or more *in vitro* fertilization treatment cycles. Proceedings of the 57th Annual Meeting of the American Society for Reproductive Medicine. 2001.

25. Emiliani S, Delbaere A, Vannin A, *et al.* Similar delivery rates in a selected group of patients, for day 2 and day 5 embryos both cultured in sequential medium: a randomized study. *Hum Reprod* 2003 ; 18 : 2145-50.

26. Fernandez-Shaw S, Cercas R, Brana C, *et al.* Ongoing and cumulative pregnancy rate after cleavage-stage *versus* blastocyst-stage embryo transfer using vitrification for cryopreservation: impact of age on the results. *J Assist Reprod Genet* 2015 ; 32 : 177-84.

27. Gaafar SH, Fourtia I, Tawil S, *et al.* Blastocyst *versus* day 2-3 transfer in ICSI cycles for male factor infertility: a multicenter randomized controlled trial. *Hum Reprod* 2015 ; 30(Suppl 1) : i217.

28. Karaki RZ, Samarraie SS, Younis NA, *et al.* Blastocyst culture and transfer: a step toward improved in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril* 2002 ; 77 : 114-8.

29. Kolibianakis EM, Zilopoulos K, Verpoest W, *et al.* Should we advise patients undergoing in-vitro fertilization to start a cycle leading to a day 3 or day 5 transfer? *Hum Reprod* 2004 ; 19 : 2550-4.

30. Motta LA, Alegretti JR, Pico M, *et al.* Blastocyst *versus* cleaving embryo transfer: a prospective randomized trial. *Fertil Steril* 1998 ; 70 (Suppl 1) : 17.

31. Pantos K, Makrakis E, Stavrou D, *et al.* Comparison of embryo transfer on day 2, day 3 and day 6: a prospective randomized study. *Fertil Steril* 2004 ; 81 : 454-5.

32. Schillaci R, Castelli A, Vassiliadis A *et al.* Blastocyst stage *versus* day 2 embryo transfer in IVF cycles. Abstracts of the 18th Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology 2002 : P-418.

33. Van der Auwera I, Debrock S, Spiessens C, *et al.* A prospective randomized study: day 2 *versus* day 5 embryo transfer. *Hum Reprod* 2002 ; 17 : 1507-12.

34. Glujovsky D, Farquhar C. Cleavage-stage or blastocyst transfer: what are the benefits and harms? *Fertil Steril* 2016 ; 106 : 244-50.

35. De Vos A, Santos-Ribeiro S, Van Landuyt L, *et al.* Cumulative live birth rates after fresh and vitrified cleavage-stage *versus* blastocyst-stage embryo transfer in the first treatment cycle. *Hum Reprod* 2016 ; 31 : 2442-9.

36. Yin Y, Chen G, Li K, Liao Q, Zhang S, Ma N, *et al.* Propensity score-matched study and meta-analysis of cumulative outcomes of day 2/3 *versus* day 5/6 embryo transfers. *Front Med* 2017 ; 11 : 563-9.

37. Martins WP, Nastri CO, Rienzi L, *et al.* Obstetrical and perinatal outcomes following blastocyst transfer compared to cleavage transfer: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod* 2016 ; 31 : 2561-9.

38. Wang X, Du M, Guan Y, *et al.* Comparative neonatal outcomes in singleton births from blastocyst transfers or cleavage-stage embryo transfers: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biol Endocrinol* 2017 ; 4 : 36-48.

39. Fanchin R, Ayoubi JM, Righini C, *et al.* Uterine contractility decreases at the time of blastocyst transfers. *Hum Reprod* 2001 ; 16 : 1115-9.

40. Nakahari T, Nishimura A, Shimamoto C, *et al.* The regulation of ciliary beat frequency by ovarian steroids in the guinea pig Fallopian tube: interactions between oestradiol and progesterone. *Biomed Res* 2011 ; 32(5) : 321-8.

41. Shao R, Egecioglu E, Weijdegård B, *et al.* Dynamic regulation of estrogen receptor-alpha isoform expression in the mouse fallopian tube: mechanistic insight into estrogen-dependent production and secretion of insulin-like growth factors. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007 ; 293 : E1430-42.

42. Zhang B, Cui L, Tang R, *et al.* Reduced ectopic pregnancy rate on day 5 embryo transfer compared with day 3: a meta-analysis. *PLoS One* 2017 ; 12 : e0169837.

43. Santos-Ribeiro S, Tournaye H, Polyzos NP. Trends in ectopic pregnancy rates following assisted reproductive technologies in the UK: a 12-year nationwide analysis including 160 000 pregnancies. *Hum Reprod* 2016 ; 31 : 393-402.

44. Li Z, Sullivan EA, Chapman M, *et al.* Risk of ectopic pregnancy lowest with transfer of single frozen blastocyst. *Hum Reprod* 2015 ; 30 : 2048-54.