

UQAR

Université du Québec
à Rimouski

**Développement squelettique, stades critiques et mortalité
embryonnaire de la tortue imbriquée (*Eretmochelys imbricata*)**

Mémoire présenté

dans le cadre du programme de maîtrise en biologie
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences

PAR

© LAURIANNE RICHARD

Novembre 2024

Composition du jury :

Christian Nozais, président du jury, Université du Québec à Rimouski

Richard Cloutier, directeur de recherche, Université du Québec à Rimouski

Alain Caron, examinateur interne, Université du Québec à Rimouski

Dépôt initial le 28 août 2024

Dépôt final le 15 novembre 2024

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI
Service de la bibliothèque

Avertissement

La diffusion de ce mémoire ou de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire « *Autorisation de reproduire et de diffuser un rapport, un mémoire ou une thèse* ». En signant ce formulaire, l'auteur concède à l'Université du Québec à Rimouski une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de son travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, l'auteur autorise l'Université du Québec à Rimouski à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de son travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits moraux ni à ses droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, l'auteur conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont il possède un exemplaire.

REMERCIEMENTS

La réalisation de ce mémoire n'aurait pas été possible sans l'aide de plusieurs personnes. Je tiens tout d'abord à remercier l'Université du Québec à Rimouski pour la qualité d'enseignement et l'encadrement professionnel que j'ai reçu tout au long de mon parcours universitaire. Je remercie ensuite mon directeur de recherche, Richard Cloutier, de m'avoir permis de réaliser mon rêve de travailler en recherche sur les tortues de mer. Merci pour ta confiance, tes conseils et ton encadrement durant ce projet de maîtrise. Merci à Anna Motta et Kier Pitogo, The University of Kansas, pour le prêt des spécimens et les photos de ceux-ci. Merci à Terry Grande, Claudia Kern et Anne Latuska, de Loyola University Chicago, pour la numérisation des spécimens. Merci à l'équipe de recherche (Charlotte Foale, Alex Lascher-Posner, Marika Breton) de la Cano Palma Biological Station (COTERC) pour les données de mortalité, mais aussi pour l'expérience incroyable de terrain que vous m'avez offerte. Merci à tous mes collègues de la station biologique pour votre soutien et les longues heures de qualité passées sur la plage en patrouille. Je remercie également tous mes camarades du Laboratoire de Paléontologie et de Biologie Évolutive (Olivia Vanhaesebroucke, Alice Tanguay, Richard Flament, Félicia Lauzon, Laurent Houle, Rocio E. Baños Rodríguez, Océanne Boisvert-Lapierre, Thomas Grünbaum) pour votre aide précieuse, votre support moral et votre amitié. Je n'aurais jamais pu y arriver sans être entourée de merveilleuses personnes comme vous. Un merci tout spécial à mon co-auteur, Laurent Houle, pour ton ingéniosité en statistiques qui m'a définitivement sauvé la vie. Merci à ma famille et surtout à mon père, Normand Richard, d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir encouragé à poursuivre aux études supérieures. Je remercie également ma meilleure amie, Laurie Provençal, pour ton soutien constant et tes conseils. Merci à Chad Lecompte, pour ton encouragement, ta patience et ton aide en statistiques. Merci à tous mes amis de l'UQAR pour ces belles années en votre compagnie. Finalement, je remercie les membres de mon jury d'évaluation, Christian Nozais et Alain Caron, pour votre expertise et vos retours constructifs.

RÉSUMÉ

Le développement embryonnaire des tortues marines, divisé en 31 stades de développement et contenant trois périodes critiques, est complexe et nécessite une recherche plus approfondie du développement du squelette et de la mortalité embryonnaire. Cette étude quantifie la squelettogenèse de la tortue imbriquée, *Eretmochelys imbricata*, afin de déterminer si le développement du squelette représente un facteur indirect potentiel de mortalité embryonnaire. Les séquences de chondrification et d'ossification ont été déterminées en utilisant des spécimens préservés dans l'éthanol et diaphanisés de différents stades de développement (stades 22 à 31) pré-éclosion. Les mortalités embryonnaires ont été enregistrées à Playa Norte, Tortuguero, Costa Rica, de 2014 à 2022. Le nombre cumulatif d'éléments squelettiques cartilagineux et ossifiés apporte plus de données sur la squelettogenèse de *E. imbricata* selon les stades de développement de Miller (1985) et ceux utilisés sur le terrain. Un seuil de développement a été découvert entre les stades 23 et 24 pour la chondrification, tandis qu'un autre a été découvert entre les stades 25 et 26 pour l'ossification. La majorité des mortalités embryonnaires a été enregistrée pour les stades 0 et 1 (stades utilisés sur le terrain), même en incluant l'exposition au soleil et la distance à la ligne de marée haute comme facteurs environnementaux limitants. En combinant les séquences de squelettogenèse avec les résultats de mortalité embryonnaire, il est possible de constater que le stade 1 utilisé sur le terrain (stades 20 à 24) est à un plus haut risque de mortalité embryonnaire. Cette période critique du développement présente une augmentation rapide d'éléments squelettiques, menant à une plus grande vulnérabilité aux facteurs extrinsèques et intrinsèques. La squelettogenèse pourrait donc être potentiellement un facteur indirect de mortalité embryonnaire.

Mots clés : Squelettogenèse ; Tortue de mer ; Ontogénie ; Seuil développemental ; Environnement

ABSTRACT

Embryonic development of sea turtles, divided into 31 developmental stages and containing three critical periods, is complex and requires further research into skeletal development and embryonic mortality. This study quantifies the skeletogenesis of the hawksbill sea turtle, *Eretmochelys imbricata*, to determine whether skeletal development could be an indirect factor leading to embryonic mortality. Chondrification and ossification sequences were determined using ethanol preserved and cleared and double-stained specimens ranging from different pre-hatching developmental stages (stages 23 to 31). Embryonic mortalities were recorded on Playa Norte, Tortuguero, Costa Rica, from 2014 to 2022. Cumulative number of cartilaginous and ossified skeletal elements provide more data on skeletogenesis in relation to Miller's (1985) developmental stages and field developmental stages. A developmental threshold was discovered between stages 23 and 24 for chondrification, while another was found between stages 25 and 26 for ossification. Most embryonic mortalities were recorded in stages 0 and 1 (field developmental stages), even by including environmental factors such as sun exposure and distance to the high tide line. Combining skeletogenesis sequences with the embryonic mortalities results shows that embryos in field developmental stage 1 (stages 20 to 24) are at a higher risk of embryonic mortality. There is a rapid increase of skeletal elements during this critical period of development, leading to a high vulnerability to external and internal stress factors. Skeletogenesis could potentially be an indirect factor leading to embryonic mortality.

Keywords: Skeletogenesis; Sea turtle; Ontogeny; Developmental threshold; Environment

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	vii
RÉSUMÉ.....	ix
ABSTRACT.....	xi
TABLE DES MATIÈRES.....	xiii
LISTE DES TABLEAUX.....	xvi
LISTE DES FIGURES.....	xviii
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
1. LES TORTUES DE MER.....	1
2. DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE ET STADES DE CROISSANCE.....	2
3. STADES CRITIQUES ET MORTALITE EMBRYONNAIRE.....	4
4. SQUELETTE DES TORTUES DE MER.....	6
5. OBJECTIFS.....	9
6. PRESENTATION DU MODELE A L'ETUDE.....	10
7. PUBLICATION.....	13
ARTICLE.....	14
1. ABSTRACT.....	15
2. INTRODUCTION.....	15
3. MATERIAL AND METHODS.....	18
4. RESULTS.....	22
5. DISCUSSION.....	31
6. CONCLUSION.....	34
7. ACKNOWLEDGMENTS.....	35
CONCLUSION GÉNÉRALE.....	36
1. RETOUR SUR LES RESULTATS.....	36

2.	ORIGINALITE DE L'ETUDE	37
3.	LIMITES DE L'ETUDE	38
4.	PERSPECTIVES.....	39
	ANNEXES	41
	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	74

LISTE DES TABLEAUX

TABLE 1. Field developmental stages (0-4) used during field seasons with corresponding Miller's (1985) developmental stages and the external morphological criteria.....	20
---	----

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1. Schéma simplifié d'un crâne d'une tortue de mer.	7
FIGURE 2. Schéma simplifié du squelette d'une tortue de mer.	9
FIGURE 3. Location of 146 <i>Eretmochelys imbricata</i> nests on Playa Norte, Tortuguero, Costa Rica, from 2015 to 2022 (GPS coordinates were not recorded in 2014).	19
FIGURE 4. C&S specimens of <i>Eretmochelys imbricata</i> . A, B: Specimen KU 290507, stage 23, in dorsal (A) and ventral (B) view (file numbers: KUDA 013956 and KUDA 013957). C, D: Specimen KU 116919, stage 31, in dorsal (C) and ventral (D) view (file numbers: KUDA 013950 and KUDA 013951). Scale bar for A and B is 1 cm; scale bar for C and D is 2 cm. Pictures by Kier Pitogo, Biodiversity Institute of The University of Kansas.	25
FIGURE 5. Micro-CT scan of <i>Eretmochelys imbricata</i> specimens. A, B: Specimen KU 116907.5, stage 26, in dorsal (A) and ventral (B) view. C, D: Specimen KU 116913, stage 31, in dorsal (C) and ventral (D) view. Scale bar is 3 cm.	26
FIGURE 6. Skeletogenesis of <i>Eretmochelys imbricata</i> according to Miller's (1985) developmental stages. A: Cumulative number of cartilaginous skeletal elements. B: Cumulative number of ossified skeletal elements. The curves represent the dose response model and the shaded area represent the IC = 95% of the predicted values.	27
FIGURE 7. Skeletogenesis of <i>Eretmochelys imbricata</i> in relation to developmental field stages. A: Cumulative number of cartilaginous skeletal elements. B: Cumulative number of ossified skeletal elements. The curves represent the dose response model and the shaded area represent the IC = 95% of the predicted values.	28
FIGURE 8. Relative embryonic mortality (%) in <i>Eretmochelys imbricata</i> according to field developmental stages. A total of 1547 mortalities were recorded.	29
FIGURE 9. Relative embryonic mortality (%) in <i>Eretmochelys imbricata</i> according to solar exposition zones. A: Total mortality registered per zone. B: Mortality according to field developmental stages per zone. A total of 1547 mortalities were recorded.	30
FIGURE 10. Relative embryonic mortality (%) in <i>Eretmochelys imbricata</i> according to the distance to the high tide line (m). A: Total mortality registered per class. B: Mortality according to field developmental stages per class. A total of 1547 mortalities were recorded.	31

INTRODUCTION GÉNÉRALE

1. LES TORTUES DE MER

Ce sont près de 230 000 espèces marines qui sont présentement décrites, représentant environ 10 % du nombre d'espèces total peuplant probablement les océans (Bouchet, 2006). Parmi ces milliers d'espèces, seules sept correspondent aux tortues de mer : la tortue verte (*Chelonida mydas*), la tortue luth (*Dermochelys coriacea*), la tortue caouanne (*Caretta caretta*), la tortue de Kemp (*Lepidochelys kempii*), la tortue olivâtre (*Lepidochelys olivacea*), la tortue à dos plat (*Natator depressus*), ainsi que la tortue imbriquée (*Eretmochelys imbricata*) (Spotila, 2004 ; Sheil, 2013 ; Pfaller *et al.*, 2018). Ces espèces font parties des deux familles de tortues marines modernes, soit les Cheloniidés (6 espèces) et les Dermochelyidés (1 espèce), les familles Toxochelyidés et Protostegidés étant éteintes (Spotila, 2004 ; Pfaller *et al.*, 2018 ; Naro-Maciel *et al.*, 2008 ; Duchene *et al.*, 2012). Les Cheloniidés et les Dermochelyidés peuplent les océans depuis près de 110 millions d'années, les plus vieux fossiles datant du début du Crétacé (Spotila, 2004 ; Naro-Maciel *et al.*, 2008 ; Duchene *et al.*, 2012).

La colonisation, ou l'expansion coloniale du 19^e siècle à la moitié du 20^e siècle, eu un effet considérable sur les populations mondiales de tortues de mer (Quammen, 2011). Avant l'arrivée des Européens en Amérique, les scientifiques estiment que, uniquement dans la mer des Caraïbes, c'était près de 100 millions de tortues vertes, 500 millions de tortues olivâtres, 10 millions de tortues caouannes ainsi que 540 000 tortues imbriquées qui peuplaient ces eaux (Spotila, 2004). Les tortues de mer avaient une place importante dans les écosystèmes marins, occupant de multiples niches écologiques dans les océans, et étaient très abondantes (Spotila, 2004). Hélas, le début de l'interaction entre les humains et les tortues a réduit de manière drastique la population mondiale de tortues de mer (Quammen, 2011). La commercialisation de la viande et des œufs, la perte et la dégradation des sites de nidification, la pollution des océans, les prises de filets de pêche et les collisions avec les bateaux sont toutes des causes anthropiques ayant mené au déclin rapide de ces espèces (Meylan et Donnelly, 1999 ; Cáceres-Farias *et al.*, 2022 ; Brunson *et al.*, 2022 ; Golden, 2016 ; Casale

et Heppell, 2016). Aujourd'hui, quatre des sept espèces de tortues marines sont classées comme étant en danger d'extinction, les trois autres étant classées comme vulnérables (IUCN, 2023). C'est pourquoi des efforts de conservation sont aujourd'hui déployés partout dans le monde.

Toutefois, l'activité humaine n'est pas la seule responsable du déclin de la population mondiale de tortues de mer. Les causes anthropiques affectent majoritairement les individus adultes, ce qui représente une infime portion des œufs originellement pondus. En effet, il est estimé que le taux de survie d'un embryon jusqu'à l'âge adulte est d'un sur 1000 (Frazer, 1992 ; Casale et Heppell, 2016). Plusieurs facteurs, étant majoritairement des processus naturels, influencent la survie des embryons et des nouveau-nés, réduisant considérablement le nombre de tortues marines qui atteindront l'âge adulte (Bell *et al.*, 2004 ; Bladow et Milton, 2019). Ces causes naturelles, pouvant engendrer de la mortalité embryonnaire, sont notamment la prédation, le taux de fertilité des femelles nicheuses, les conditions environnementales, les infections bactériennes et parasitaires, ainsi que le développement (Bell *et al.*, 2004 ; Whitmore et Dutton, 1985 ; Bladow et Milton, 2019 ; Patrício *et al.*, 2019 ; Laloë *et al.*, 2017 ; Stephenson, 2014 ; Bishop *et al.*, 1991 ; Soslau *et al.*, 2011).

2. DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE ET STADES DE CROISSANCE

Chez les tortues marines, le développement embryonnaire est grandement affecté par le site de ponte sélectionné par la femelle nicheuse, puisque les embryons se développent au sein même de ce site (Sheil, 2013). Les œufs de toutes les espèces de tortues de mer ont une coquille souple et sont très poreux, ce qui permet aux embryons de faire plusieurs types d'échanges avec le milieu (Ackerman *et al.*, 1985 ; Packard et Packard, 1984). En effet, pour se développer adéquatement, les embryons échangent de la chaleur, de l'eau ainsi que des gaz respiratoires avec le substrat de leur chambre d'incubation (Ackerman *et al.*, 1985 ; Packard et Packard, 1984). Il est primordial que ce dernier ait des propriétés optimales de conductivité thermique et de transport des éléments (Ackerman *et al.*, 1985). Le couvert végétal va également influencer les échanges, puisqu'il va modifier les paramètres physico-

chimiques du substrat en fonction de sa densité (Horton, 1989). Un sol situé sous la canopée est plus humide et plus frais, tandis qu'un sol plus sec et plus chaud s'observe en absence de couvert végétal (Horton, 1989). Ce sont les caractéristiques physico-chimiques de l'environnement, plus précisément du substrat et du couvert végétal, qui vont réguler l'isolation thermique et hydrique ainsi que les échanges de gaz entre les embryons et l'environnement, d'où l'importance de la sélection du site de ponte pour le développement (Sheil, 2013 ; Ackerman *et al.*, 1985 ; Packard et Packard, 1984).

La caractérisation des stades de croissance permet de décrire les changements ontogénétiques que subissent les embryons durant le temps d'incubation, afin de mieux comprendre le développement de ceux-ci, et de comparer les patrons développementaux entre différentes espèces (Miller *et al.*, 2017 ; Sheil, 2003 ; Rieppel, 1993). Toutefois, en ce qui concerne les tortues marines, cela permet notamment d'identifier plus facilement, à l'aide de caractères morphologiques internes et externes, le stade de développement pendant lequel un embryon est mort en milieu naturel (Miller *et al.*, 2017). Cette donnée est grandement utile afin d'identifier les facteurs environnementaux ou développementaux potentiels de mortalité embryonnaire au site de ponte puisque, comme mentionné ci-haut, le développement des embryons est fortement influencé par le milieu (Miller *et al.*, 2017).

Le développement embryonnaire des tortues de mer a été documenté et divisé en 31 stades selon la croissance de certaines structures externes et internes (Miller *et al.*, 2017 ; Miller, 1985 ; Crastz, 1982 ; Al-Mukhaini *et al.*, 2010). La caractérisation des stades de développement de Miller (1985) est la plus utilisée. Les stades intraoviductes (stades 1-5) ont été déterminés avec le nombre et la taille des blastomères et des sillons de segmentation de l'embryon (Miller, 1985). Les stades post-oviposition (stades 6-10) ont été définis grâce au changement de forme du blastopore et à la différenciation de la notochorde et du tube neural dorsal (Miller *et al.*, 2017 ; Miller, 1985). Les stades 11-22 ont été déterminés selon le nombre de somites, la différenciation de la tête, la pigmentation des yeux ainsi que des fentes pharyngiennes (Miller *et al.*, 2017 ; Miller, 1985). Les stades 23-31 ont été définis en fonction de la formation de la carapace, du développement de la pigmentation et des écailles

ainsi que du changement de volume de l'embryon par rapport au volume du sac vitellin (Miller *et al.*, 2017 ; Miller, 1985).

La caractérisation établie des stades de croissance s'applique à toutes les espèces de tortues marines avec quelques différences notables entre les groupes taxonomiques vers la fin du développement (Miller *et al.*, 2017). Ces différences de patrons de croissance se voient au stade 23 au niveau des deux familles, et au stade 25 pour les genres (Miller *et al.*, 2017). C'est ensuite au stade 26 qu'il y aura des particularités pour chaque espèce, où l'identification des progénitures se fait grâce aux caractéristiques des adultes (Miller *et al.*, 2017).

3. STADES CRITIQUES ET MORTALITE EMBRYONNAIRE

Le développement d'un embryon peut engendrer de la mortalité embryonnaire en raison de stades particulièrement à risque, appelés stades ou périodes critiques (Bell *et al.*, 2004 ; Heyer et Meredith, 2017). Une période critique représente, en biologie du développement, un stade de croissance durant lequel le développement d'un organisme est le plus susceptible d'être modifié autant par des facteurs intrinsèques qu'extrinsèques (Heyer et Meredith, 2017). Durant ces périodes, plusieurs changements développementaux essentiels à la survie se produisent, menant à des modifications permanentes au niveau de la physiologie, de la morphologie et du comportement des organismes (Heyer et Meredith, 2017). Il s'agit également d'une période où le degré de vulnérabilité du système nerveux aux facteurs internes et environnementaux augmente considérablement (Heyer et Meredith, 2017). Cela signifie qu'une exposition trop élevée à ceux-ci pourrait causer des anomalies développementales (Heyer et Meredith, 2017).

En ce qui concerne le développement des tortues de mer, particulièrement chez les tortues luth, il existe trois périodes critiques associées avec une plus forte vulnérabilité à la mortalité embryonnaire, soient autour des stades 6, 22 et 30 de Miller (1985) (Bell *et al.*, 2004 ; Miller, 1985). Toutefois, les fonctions physiologiques affectées, pouvant mener à la mortalité embryonnaire, sont peu documentées (Bell *et al.*, 2004). Le stade 6 est une période critique dans le développement des tortues marines puisqu'il s'agit du stade au

moment où a lieu l'oviposition (Bell *et al.*, 2004 ; Miller *et al.*, 2017). Durant ce stade, l'embryon peut être affecté autant par l'état de santé de la femelle nicheuse que par des contaminants chimiques ou des bactéries se retrouvant dans le site de nidification (Bell *et al.*, 2004). Puisqu'il n'y a pas de soins parentaux après la ponte des œufs, les embryons doivent survivre grâce aux réserves nutritionnelles (vitellus et albumen) produites par la mère (Perrault *et al.*, 2012). Ces réserves sont représentatives de la diète, des nutriments et même des composés chimiques néfastes pouvant avoir été ingérés par la femelle avant la ponte, ayant directement un effet sur les embryons (Alava *et al.*, 2006). Le vitellus et l'albumen reflètent également l'état de santé de la mère, puisqu'un individu avec un état de santé non optimal produit des réserves avec un déficit nutritionnel (Perrault *et al.*, 2012). Il y a alors transmission de plusieurs paramètres biochimiques de la femelle nicheuse aux embryons, tels que les taux de calcium ou de cholestérol, ce qui influence directement ces derniers (Perrault *et al.*, 2012). Les embryons sont également affectés par des contaminants du site de ponte puisqu'ils se retrouvent en contact direct avec l'environnement (Bishop *et al.*, 1991). Un site de ponte contenant une grande concentration en composés chimiques toxiques peut mener à une hausse d'anomalies développementales chez les embryons de tortues marines (Bishop *et al.*, 1991). De même, un site de nidification hautement infecté par des bactéries pathogènes peut également mener à un arrêt du développement chez les embryons (Soslau *et al.*, 2011).

Le stade 22 est le deuxième stade critique reconnu, étant la période de la détermination du sexe des embryons en fonction de la température (Bell *et al.*, 2004). En effet, comme chez plusieurs reptiles non aviens, la température d'incubation va déterminer le sexe des embryons chez les tortues de mer (Bell *et al.*, 2004 ; Bladow et Milton, 2019 ; Standora et Spotila, 1985). Durant cette courte période du développement, la température environnante va affecter la différenciation sexuelle des embryons, ce qui engendre de nombreux changements permanents au niveau des organes de reproduction, des gonades et de la morphologie (Yntema et Mrosovsky, 1982). Le stade 22 est aussi une période du développement présentant une croissance et une organogénèse très rapides, demandant l'implication simultanée de plusieurs processus physiologiques (Bell *et al.*, 2004). Si ces derniers sont ralentis ou interrompus par des conditions environnementales non optimales, notamment la

température et l'humidité, l'embryon pourrait subir des déformations et voir son développement arrêté (Bell *et al.*, 2004).

Le stade 30 représente la dernière période considérée comme étant critique dans le développement des tortues marines puisqu'il s'agit du moment où les embryons vont percer la coquille de leur œuf à l'aide de leur bec corné (Bell *et al.*, 2004). Si les embryons sont trop faibles ou présentent des malformations nuisibles à ce processus, tels qu'une fente palatine (fissure du palais) ou une absence de caroncule, ils seront incapables de percer la coquille et donc d'en sortir (Bell *et al.*, 2004).

4. SQUELETTE DES TORTUES DE MER

Composé de cartilages et d'os, le squelette des tortues de mer est divisé en trois parties principales : le crâne, le squelette axial ainsi que le squelette appendiculaire (Wyneken, 2001). Le crâne est composé d'os épais permettant aux tortues marines de résister aux changements de pression du milieu océanique (Spotila, 2004). Il comprend le neurocrâne, le splanchnocrâne, le dermatocrâne ainsi que la mâchoire inférieure (Wyneken, 2001). Le neurocrâne est formé des structures osseuses renfermant le cerveau et une partie des nerfs crâniens, ce qui comprend les opisthotiques, les prootiques, le supraoccipital, le basioccipital, les exoccipitaux, le basisphénoïde ainsi que les columelles (Sheil, 2013 ; Gray, 2023 ; Wyneken, 2001). Le splanchnocrâne comprend le squelette branchial-hyoïde (référé plus souvent comme squelette hyoïde dans la littérature), composé de l'os cératohyal et les os cératobranchiaux, ainsi que le carré (Sheil, 2013 ; Wyneken, 2001). Pour ce qui est du dermatocrâne (Fig. 1), celui-ci comprend les éléments osseux de la mâchoire supérieure, du palais et du toit crânien (Sheil, 2013 ; Gray, 2023). Il est composé des prémaxillaires, des maxillaires, des préfrontaux, des frontaux, des postorbitaux, des pariétaux, des squamosaux, des palatins, des vomers, des ptérygoïdes, des jugaux et des quadratojugaux (Sheil, 2013 ; Gray, 2023). En ce qui concerne la mâchoire inférieure (Fig. 1), celle-ci comprend les dentaires, les angulaires, les articulaires, les coronoïdes, les surangulaires et les préarticulaires (Sheil, 2013 ; Gray, 2023). Le crâne des tortues a été sujet à de nombreux

débats phylogénétiques en raison de l'absence de la double fenestration temporelle, plaçant ces espèces autant comme des diapsides que des anapsides (Lecoindre et Le Guyader, 2017).

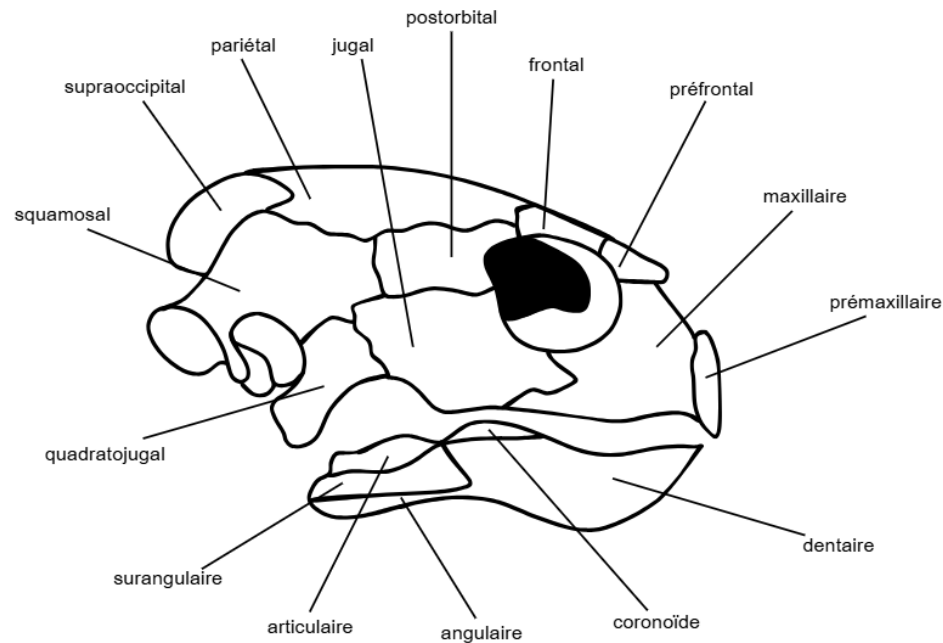


FIGURE 1. Schéma simplifié d'un crâne d'une tortue de mer.

Le squelette axial comprend la carapace et le plastron (Wyneken, 2001). En ce qui concerne la carapace, celle-ci est composée des côtes, des vertèbres et des os dermiques de la carapace (Fig. 2). Ces derniers sont formés par la fusion des côtes et de la colonne vertébrale avec des os dermiques, et sont divisés en trois parties, soient les os neuraux, les os pleuraux et les os périphériques (Wyneken, 2001). Les os neuraux se retrouvent dorsalement à la colonne vertébrale, les os pleuraux dorsalement aux côtes, et les os périphériques forment la marge de la carapace. Lors du développement, les côtes vont s'allonger latéralement pour aller rejoindre les os périphériques, tandis que les os pleuraux vont s'épaissir pour aller se joindre (Spotila, 2004 ; Wyneken, 2001). Les vertèbres sont séparées en cinq sections distinctes, soient les vertèbres cervicales, les vertèbres thoraciques, les vertèbres lombaires, les vertèbres sacrées et les vertèbres caudales (Wyneken, 2001). En ce qui concerne le plastron, celui-ci est composé des os du plastron, éléments osseux retrouvés uniquement chez

les chéloniens (Fig. 2) (Spotila, 2004). Ceux-ci comprennent les épipلاstrons, l'entopلاstron, les hyopلاstrons, les hypopلاstrons ainsi que les xiphopلاstrons (Wyneken, 2001). Ceux-ci se développent à partir de dérivés des cellules embryonnaires du crâne et vont s'accroître jusqu'à fusionner les uns avec les autres, formant le پلاstron (Spotila, 2004).

Le squelette appendiculaire comprend les nageoires antérieures et postérieures, incluant les ceintures pectorale et pelvienne (Wyneken, 2001). Les nageoires antérieures sont composées de l'humérus, du radius, du cubitus, des os carpiens, des métacarpes ainsi que des phalanges (Fig. 2) (Sheil, 2003). Les os carpiens retrouvés chez les tortues marines sont les os carpiens distaux, le pisiforme, l'intermédiaire, le cubital et les centraux (Sheil, 2003). Les nageoires postérieures sont composées du fémur, du tibia, du péroné, des os tarsiens, des métatarses ainsi que des phalanges (Fig. 2) (Sheil, 2003). Les os tarsiens comprennent les os tarsiens distaux, les centraux, l'intermédiaire ainsi que le fibulaire (Sheil, 2003). Les membres des tortues de mer sont hautement spécialisés pour nager rapidement et leur permettre d'effectuer de longues migrations (Spotila, 2004). Les os supérieurs des nageoires sont plus courts et plus épais, comparativement aux autres reptiles, et sont plus près du corps (Spotila, 2004). Les os inférieurs sont également plus courts, et ceux qui composent le reste des nageoires sont de forme aplatie et allongée (Spotila, 2004). La ceinture pectorale comprend les scapulaires, les coracoïdes et les acromions, tandis que la ceinture pelvienne est composée des pubis, des ilions ainsi que des ischions (Fig. 2) (Sheil, 2003 ; Wyneken, 2001). Les ceintures pectorale et pelvienne diffèrent de celles retrouvées chez les autres amniotes puisqu'elles sont situées à l'intérieur de la cage thoracique, ici la carapace, et sont ventrales aux vertèbres (Wyneken, 2003).

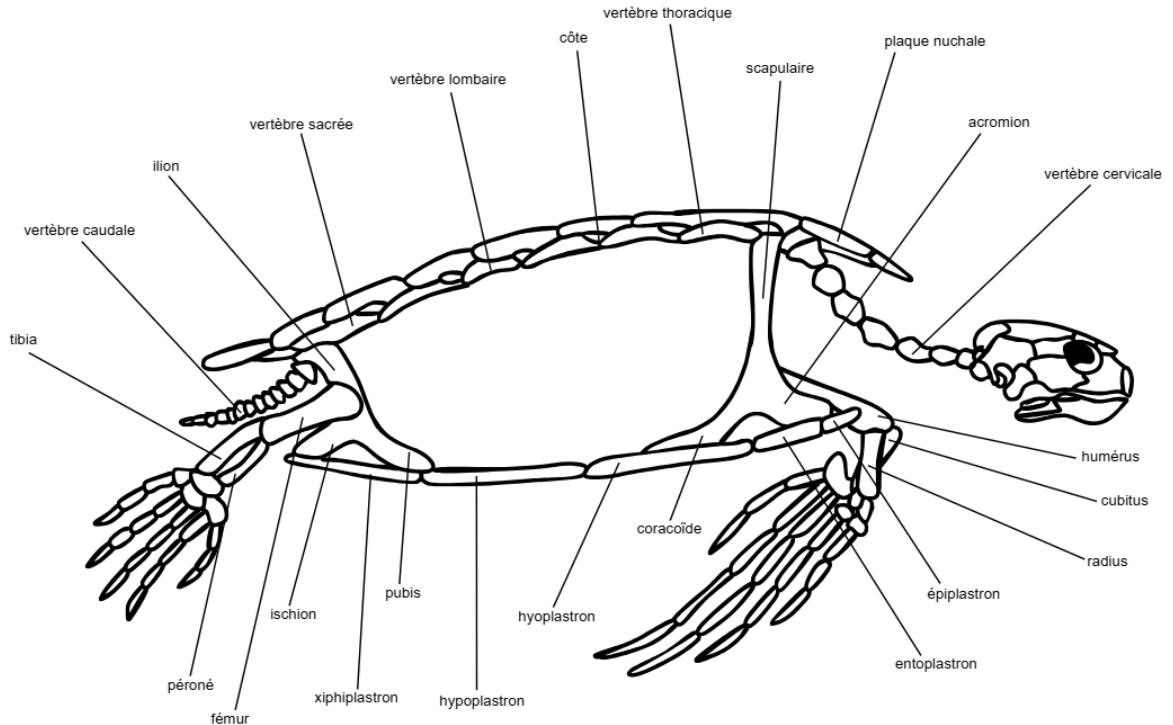


FIGURE 2. Schéma simplifié du squelette d'une tortue de mer.

5. OBJECTIFS

La présente étude a pour but de (1) quantifier les patrons de chondrification et d'ossification des os crâniens et postcrâniens durant le développement embryonnaire de la tortue imbriquée, *Eretmochelys imbricata*. Cela va permettre de mieux définir et caractériser les stades de développement retrouvés dans la littérature puisque la squelettogenèse n'est pas pris en compte dans la caractérisation actuelle des stades embryonnaires des tortues marines (Miller *et al.*, 2017 ; Miller, 1985). Il sera également question de (2) déterminer si le développement squelettique des os crâniens et postcrâniens fait partie des facteurs indirects potentiels de mortalité embryonnaire d'*E. imbricata*. Cela permettra de mieux prédire les taux de succès des nids d'Amérique Centrale de cette espèce, grâce à une meilleure compréhension des mécanismes derrière la mortalité embryonnaire. Puisqu'il s'agit d'une espèce en danger critique d'extinction, ces connaissances pourraient constituer un nouvel outil utilisable dans un but de conservation (Bell *et al.*, 2004). Comme prédictions, les

séquences de squelettogenèse devraient être similaires à celles présentées dans Sheil (2003, 2013), avec de nouvelles données basées sur la quantification des patrons de chondrification et d'ossification. Les mortalités embryonnaires retrouvées en milieu naturel devraient être plus élevées pendant les périodes critiques du développement, et celles-ci devraient correspondre aux patrons de chondrification et d'ossification.

6. PRESENTATION DU MODELE A L'ETUDE

La tortue imbriquée, *Eretmochelys imbricata*, est l'une des six espèces de la famille des Cheloniidae et la seule représentante de son genre, partageant un ancêtre commun avec la tortue caouanne (*Caretta caretta*) datant d'il y a 30 millions d'années (Pfaller *et al.*, 2018 ; Duchene *et al.*, 2012 ; Naro-Maciel *et al.*, 2008). Espèce migratrice, elle peuple majoritairement les eaux tropicales et subtropicales des océans Atlantique, Pacifique et Indien, et est retrouvée dans plusieurs types d'habitats tels que les récifs coralliens ou les eaux côtières à substrat vaseux qui supportent sa diète omnivore (Spotila, 2004 ; Naro-Maciel *et al.*, 2008 ; Van Houtan *et al.*, 2016).

Depuis 1996, *E. imbricata* se retrouve sur la liste rouge de l'IUCN (International Union for Conservation of Nature) et est classée comme étant une espèce en danger critique d'extinction, en raison d'un déclin de plus de 80% de la population mondiale depuis les trois dernières générations (~105 ans) (IUCN, 2023 ; Meylan et Donnelly, 1999). Tout comme les autres espèces de tortues marines, la perte et la dégradation de leur habitat ainsi que leur braconnage à des fins commerciales représentent leurs principales menaces (Meylan et Donnelly, 1999). Cependant, *E. imbricata* est l'espèce de tortue de mer ayant le plus haut taux de ponte (Spotila, 2004). Les femelles peuvent pondre environ 130 œufs dans un même nid, et ce, trois à cinq fois par saison de nidification, à intervalle de 13 à 16 jours (Spotila, 2004). Leur saison de nidification revient à chaque trois ans à partir de l'atteinte de la maturité sexuelle entre 20 et 25 ans (Spotila, 2004). Malgré un nombre élevé d'œufs pondus par saison, *E. imbricata* connaît un succès d'éclosion très variable de 79 à 92%, en raison de la mortalité embryonnaire (Spotila, 2004).

La quantification des patrons de chondrification et d'ossification au niveau embryonnaire d'*E. imbricata* permettrait de mieux définir et caractériser les stades de croissance de Miller (1985). En effet, le développement du squelette n'est pas pris en compte lors de la caractérisation actuelle des stades de croissance des tortues marines. Il serait intéressant d'intégrer les structures squelettiques et les seuils développementaux comme critères de reconnaissance afin d'apporter de plus grandes précisions lors de l'identification du stade de développement d'un embryon. De plus, le développement squelettique d'*E. imbricata* étant peu étudié, la présente étude permettra d'apporter davantage de connaissances scientifiques. Sheil (2003 ; 2013) a étudié exhaustivement les séquences de squelettogenèse crâniennes et post-crâniennes en fonction des stades de développement, sans toutefois quantifier les séquences. Seules les données crâniennes ont été publiées, laissant place à une recherche plus approfondie au niveau du squelette axial et appendiculaire. Il est attendu que les patrons de squelettogenèse observés concordent avec ceux décrits par Sheil (2003 ; 2013), en ayant de nouvelles précisions basées sur la quantification des patrons de chondrification et d'ossification.

En plus d'apporter de nouvelles informations sur le développement, l'étude des patrons de squelettogenèse pourrait suggérer des réponses quant aux causes de mortalité embryonnaire. En effet, le développement squelettique n'a jamais été pris en compte comme étant un potentiel facteur limitant lors de la croissance d'un embryon. En effet, les patrons de chondrification et d'ossification pourraient correspondre avec les périodes critiques du développement des tortues marines, rendant l'embryon plus vulnérable. Il serait intéressant d'analyser la relation entre le développement squelettique et la mortalité embryonnaire, afin de déterminer si celui-ci pourrait en être une cause indirecte. Il est attendu qu'il y ait un plus grand nombre de mortalités embryonnaires lors des stades critiques de développement, et que ces derniers concordent avec les patrons de chondrification et d'ossification (Bell *et al.*, 2004). Cela permettrait d'expliquer les taux élevés de mortalité embryonnaire retrouvés en milieu naturel et n'étant pas liés aux facteurs environnementaux limitants.

En ce qui concerne l'étude des patrons de chondrification et d'ossification, des spécimens d'*E. imbricata* ont été scannés à l'aide d'un micro-CT-scan. Cela a permis d'analyser la présence ou l'absence des différentes structures osseuses en fonction des stades de développement, afin d'établir les patrons de chondrification et d'ossification. Il a été possible d'utiliser ces informations pour mieux définir les stades de développement décrits dans la littérature, en incorporant le squelette comme caractère d'identification. En ce qui concerne l'étude de la relation entre le développement et la mortalité embryonnaire, des données de mortalité en milieu naturel, en fonction des stades de croissance, ont été comparées aux patrons de chondrification et d'ossification. Cela a permis d'établir un lien entre les stades critiques de croissance, le développement squelettique ainsi que la mortalité observée sur le terrain. Des analyses de facteurs environnementaux, tels que l'exposition au soleil et la distance à la ligne de marée haute, ont été incorporées à l'étude afin d'évaluer le biais potentiel engendré par le milieu naturel sur la mortalité embryonnaire.

Les spécimens d'*E. imbricata* utilisés dans ce mémoire proviennent de la collection d'herpétologie du Biodiversity Institute et du Natural History Museum de l'University of Kansas. Les spécimens ont été sélectionnés en fonction de leurs stades de développement et de leur lieu de provenance. Afin de compléter la séquence d'ossification embryonnaire, et de respecter les limitations de dimensions associées à l'utilisation d'un micro-CT-scan, les spécimens devaient respecter une taille maximale de 8 cm de longueur de carapace. Les spécimens devaient également provenir d'Amérique Centrale, afin qu'ils aient été soumis à des conditions environnementales similaires à celles des spécimens relevés dans les données de mortalité embryonnaire. L'échantillon comportait deux types de spécimens, soient les spécimens conservés dans l'éthanol et les spécimens diaphanisés (cleared and double-stained ; C&S). En ce qui concerne les spécimens conservés, ils ont été scannés à Loyola University Chicago et les scans reconstruits nous ont été envoyés par Dr. Terry Grande. Les scans ont été segmentés avec le logiciel Dragonfly (Dragonfly 2022.2). En ce qui concerne les spécimens diaphanisés, ils ont été photographiés par Kier Pitogo à The University of Kansas et les photos nous ont été envoyées par Dr. Anna Motta. Les photos ont été analysées avec le logiciel Fiji (Schindelin *et al.*, 2012).

Les données de mortalité embryonnaire présentées proviennent de la Cano Palma Biological Station (COTERC) située à Tortuguero au Costa Rica. Ces données résultent d'excavations de nids réalisées sur le terrain afin de relever les taux de mortalité par stades de développement des embryons d'*E. imbricata*. Les fichiers de données nous ont été fournis par Alex Lascher-Posner et Marika Breton, et certaines données ont été personnellement collectées.

7. PUBLICATION

L'article de ce mémoire a été formaté pour être soumis à la revue *Chelonian Conservation and Biology*. Laurianne Richard, première auteure, a développé le projet, récolté certaines données de mortalité en 2022, segmenté les scans ainsi que travaillé à l'interprétation des résultats sur les séquences de squelettogenèse et la mortalité embryonnaire. Richard Cloutier, directeur et dernier auteur, a conceptualisé le projet, a contribué au codage des éléments squelettiques et a révisé l'article. Laurent Houle, second auteur, a programmé les analyses statistiques des patrons de squelettogenèse ainsi que l'intelligence artificielle ayant contribué à la segmentation des scans. Le titre provisoire de l'article est « Skeletal development, critical periods and embryonic mortality of the hawksbill sea turtle (*Eretmochelys imbricata*) ».

**SKELETAL DEVELOPMENT, CRITICAL PERIODS AND EMBRYONIC
MORTALITY OF THE HAWKSBILL SEA TURTLE (*ERETMOCHELYS
IMBRICATA*)**

Laurianne Richard^{1*}, Laurent Houle¹, and Richard Cloutier^{1,2}

Running title: Skeletogenesis in hawksbill sea turtle

¹ *Laboratory of Paleontology and Evolutionary Biology, Département de biologie, chimie et géographie, Université du Québec à Rimouski, 300 allée des Ursulines, Rimouski, Québec, G5L 3A1, Canada.*

² *Excellence Center in Evolution of Life, Basin Studies and Applied Paleontology, Palaeontological Research and Education Centre, Mahasarakham University, Maha Sarakham 44150, Thailand*

*Correspondence to: Laurianne Richard, Laboratory of Ecotoxicogenomics and Endocrine Disruption, Centre Eau Terre Environnement, Institut National de la Recherche Scientifique, 490 rue de la Couronne, Québec, Québec, G1K 9A9, Canada.

Funding Information: Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) Discovery Grant RGPIN-2019-06133 to RC

1. ABSTRACT

Embryonic development of sea turtles, divided into 31 developmental stages and containing three critical periods, is complex and requires further research into skeletal development and embryonic mortality. This study quantifies the skeletogenesis of the hawksbill sea turtle, *Eretmochelys imbricata*, to determine whether skeletal development could be an indirect factor leading to embryonic mortality. Chondrification and ossification sequences were determined using ethanol preserved and cleared and double-stained specimens ranging from different pre-hatching developmental stages (stages 23 to 31). Embryonic mortalities were recorded on Playa Norte, Tortuguero, Costa Rica, from 2014 to 2022. Cumulative number of cartilaginous and ossified skeletal elements provide more data on skeletogenesis in relation to Miller's (1985) developmental stages and field developmental stages. A developmental threshold was discovered between stages 23 and 24 for chondrification, while another was found between stages 25 and 26 for ossification. Most embryonic mortalities were recorded in stages 0 and 1 (field developmental stages), even by including environmental factors such as sun exposure and distance to the high tide line. Combining skeletogenesis sequences with the embryonic mortalities results shows that embryos in field developmental stage 1 (stages 20 to 24) are at a higher risk of embryonic mortality. There is a rapid increase of skeletal elements during this critical period of development, leading to a high vulnerability to external and internal stress factors. Skeletogenesis could potentially be an indirect factor leading to embryonic mortality.

KEYWORDS: Skeletogenesis; Sea Turtle; Ontogeny; Developmental threshold; Environment

2. INTRODUCTION

Modern sea turtles have inhabited oceans for more than 120 million years, with the oldest fossil dating from the Lower Cretaceous (upper Barremian-lower Aptian, >120 Ma) (Cadena and Parham 2015; Hirayama 1998). However, it is still debated that some Late Triassic stem turtles were marine but retained terrestrially adapted appendages (Li *et al.* 2008; Vermeij and Motani 2018). Of the four families of sea turtles living during the Cenozoic, only two remain: the Cheloniidae [composed of green sea turtle (*Chelonia mydas*), loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*), Kemp's ridley sea turtle (*Lepidochelys kempii*), olive ridley sea turtle (*Lepidochelys olivacea*), flatback sea turtle (*Natator depressus*), hawksbill sea turtle (*Eretmochelys imbricata*)] and the Dermochelyidae

[composed of leatherback sea turtle (*Dermochelys coriacea*)] (Pfaller *et al.* 2018; Duchene *et al.* 2012; Naro-Maciel *et al.* 2008). Being only seven species out of 476 turtles and tortoises, sea turtles have been the focus of numerous research on their development, reproduction, locomotion, behavior, demography and ecology (Naro-Maciel *et al.* 2008; Duchene *et al.* 2012; Thomson 2021).

Sea turtles ontogeny has previously been described leading to the identification of 31 developmental stages from segmentation to hatching (Miller 1985; Miller *et al.* 2017; Al-Mukhaini *et al.* 2010; Crastz 1982). These stages were characterized using only external morphological criteria (Miller 1985; Miller *et al.* 2017; Al-Mukhaini *et al.* 2010; Crastz 1982). Intra-oviductal stages (stages 1-5) were determined by the number and size of blastomeres and segmentation furrows in the embryo (Miller 1985). Post-oviposition stages (stages 6-10) were defined by blastopore shape change and differentiation of the notochord and dorsal neural tube (Miller 1985; Miller *et al.* 2017). Stages 11-22 were determined by somite number, head differentiation, eye pigmentation and pharyngeal clefts (Miller 1985; Miller *et al.* 2017). Stages 23-31 were defined according to carapace formation, development of pigmentation and scales, and the relative change in the volume of the embryo and yolk sac (Miller 1985; Miller *et al.* 2017). These criteria do not provide information on the internal morphological changes that occur during embryonic development, especially not on skeletogenesis. Chondrification and ossification patterns can be more accurate than standard developmental stages, as proven in many studies (Sheil 2003, 2013; Rieppel 1993). Sheil (2013) published an exhaustive sequence of chondrification and ossification of the skull and lower jaw of *E. imbricata*. In addition, he integrated this cranial sequence to the standard staging of turtles. Completing the skeletogenesis sequences with the axial and appendicular skeleton and quantifying these sequences could better define embryonic skeletal development in sea turtles according to developmental stages.

A more precise identification of the developmental stages of sea turtles could help to better understand natural embryonic mortality (Bell *et al.* 2004). Embryos survival relies on the interactions among multiple factors: optimal nest environmental conditions (e.g.,

temperature, hydric environment, gas exchange, canopy cover), absence of predators and/or harmful bacteria and parasites, favorable nesting female fertility, and an uninterrupted development (Bell *et al.* 2004; Whitmore and Dutton 1985; Bladow and Milton 2019; Perrault *et al.* 2012; Soslau *et al.* 2011; Ackerman *et al.* 1985; Packard and Packard 1984; Sheil 2013). Embryonic mortality could be the result of one or more physiological processes that are disrupted, which is prone to happen during critical periods (Bell *et al.* 2004; Heyer and Meredith 2017). In sea turtles, three critical periods have been identified previously: stages 6 (post-oviposition), 22 (temperature sex determination) and 30 (pipping of the egg) (Bell *et al.* 2004). Although critical stages have been identified, the physiological mechanisms associated to these stages remain undescribed (Bell *et al.* 2004). Considering skeletal development as a potential limiting factor that could lead to embryonic mortality could be insightful to better understand critical periods in sea turtles.

The hawksbill sea turtle, *Eretmochelys imbricata*, is one of six species in the Cheloniidae family and the only representative of its genus (Sheil 2003; Duchene *et al.* 2012; Naro-Maciel *et al.* 2008). It is the sister-group of the loggerhead sea turtle, *Caretta caretta*, and the ridley's genus, *Lepidochelys* (Duchene *et al.* 2012; Naro-Maciel *et al.* 2008). Being a highly migratory species, *E. imbricata* inhabits mainly tropical and subtropical waters of the Atlantic, Pacific and Indian oceans (Spotila 2004; Van Houtan *et al.* 2016). *E. imbricata* occupies several habitat types such as coastal waters with muddy substrates and coral reefs to support its omnivorous diet (Spotila 2004; Sheil 2013; Naro-Maciel *et al.* 2008; Van Houtan *et al.* 2016). Since 1996, *E. imbricata* has been on the IUCN Red List (IUCN 2023; Meylan and Donnelly 1999). It is therefore classified as Critically Endangered due to a decline of over 80% in the global population over the last three generations (~105 years) (IUCN 2023; Meylan and Donnelly 1999).

The main purpose of the present study is to quantify the chondrification and ossification sequences of the cranial and postcranial bones of *E. imbricata* until hatching. Skeletogenic data will be correlated with the standard Miller's developmental stage (Miller *et al.* 2017; Miller 1985). It will also be investigated whether skeletal development could be

an indirect factor leading to embryonic mortality in *E. imbricata*. This will enable better prediction of Central American nests success rates of this species, due to a better understanding of natural embryonic development. Since this is a critically endangered species, this knowledge could provide a new tool for conservation purposes. As predictions, the skeletogenesis sequences are expected to be similar to those presented in Sheil (2003, 2013), with new data based on the quantification of chondrification and ossification patterns. Embryonic mortalities are expected to be higher during critical periods of development, and that these will be consistent with chondrification and ossification patterns.

3. MATERIAL AND METHODS

3.1 Specimens and data acquisition

Forty-five hatchlings and embryos of *E. imbricata* (Linnaeus, 1766) were examined to determine skeletogenesis. Twenty-one specimens were cleared and double-stained (by Sheil (2003) following Wassersug (1976) and Taylor and Van Dyke (1985) techniques), as the other twenty-four were ethanol preserved (Annex 1). Specimens come from the herpetological collection of the Biodiversity Institute of the University of Kansas (Annex 1). All specimens were collected by Charles W. Myers in 1966 from Isla Escudo de Veraguas, an island in Bocas del Toro Province, Panama (Annex 1). As an IUCN Red-Listed species, the specimens were collected before the 1996 listing (IUCN 2023; Meylan and Donnelly 1999). Specimens were selected according to their size and location of origin. The scanned specimens had to have a carapace length of less than 8 cm to respect the size limitations associated with the use of the micro-CT-scan. Specimens had to come from Central America in order to have been exposed to environmental conditions similar to those of the specimens used for the embryonic mortality data.

Data on embryonic mortality of *E. imbricata* come from the database of Cano Palma Biological Station (COTERC), located in Tortuguero, Costa Rica (Annex 2). Data were collected from 146 nests excavated from 2014 to 2022 on a 5km transect on Playa Norte (Fig.

3; Annex 2). GPS easting and northing coordinates (with an average accuracy of 3m) were recorded for each nest from 2015 to 2022 (Fig. 3). The nests were excavated and the eggs opened only when a nest showed no signs of hatchlings emergence (i.e., 10 days after the average incubation time of 60 days). Mortalities were recorded as the number of dead embryos per nest, and each dead embryo was staged according to five field developmental stages inspired by Miller's (1985) developmental stages (Table 1).

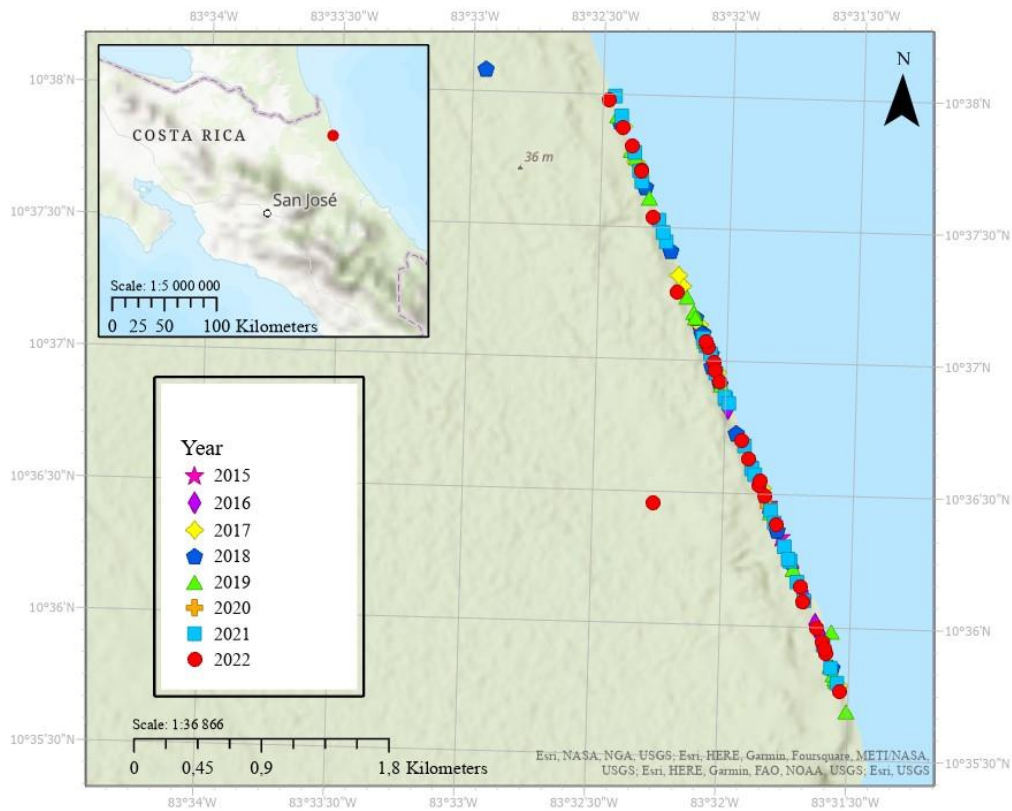


FIGURE 3. Location of 146 *Eretmochelys imbricata* nests on Playa Norte, Tortuguero, Costa Rica, from 2015 to 2022 (GPS coordinates were not recorded in 2014).

TABLE 1. Field developmental stages (0-4) used during field seasons with corresponding Miller’s (1985) developmental stages and the external morphological criteria.

Field developmental stages	Miller’s developmental stages	Morphological criteria
0	6 – 19	Not visible to the human eye
1	20 – 24	No body pigmentation, eyes pigmented
2	25 – 26	Scales with beginning of pigmentation, embryo smaller than yolk
3	27 – 28	Hatchling pigmentation and morphology present, embryo same size as yolk
4	29 – 31	Embryo bigger than yolk, plastron folded around the remaining yolk

Mortality data included environmental parameters to describe nest incubation conditions: (1) sun exposure and (2) distance of the nests from the high tide line (in m). Sun exposure was estimated by canopy cover. It divided the width of the beach into three zones: (1) Open (0-50% shading), (2) Border (50-99% shading) and (3) Vegetation (100% shading). It was used to assess the general temperature in the nest during incubation since canopy cover is closely related to the physico-chemicals parameters of the substrate. Distance from the high tide line was measured in a straight line from the most recent high tide line to the center of the egg chamber, when available, or the center of the nest. It was used to assess the general humidity in the nest during the incubation since the proximity of the tidal wave is closely related to the egg chamber’s moistness.

3.2 Measurements and data analysis

Ethanol preserved specimens were micro-CT-scanned and reconstructed with a PerkinElmer Quantum GX2 Micro-CT-scanner at Loyola University Chicago (Illinois, USA)

using fixed parameters (14 minutes on high resolution, 90 kV, 88 μ A, 0.06 copper and 0.5 aluminum filter, field of view of 72 mm, voxel size of 144 μ m). The reconstructions were made with 3D-Slicer (Fedorov *et al.* 2012) and generated DICOM files. Dragonfly 2022.2 was used for the segmentation of the skeleton using a trained AI created with fixed parameters (2.5D method, five layers and 112 starting squares). The AI tool was trained with 10 to 50 images from different parts of the skeleton per specimen. Cleared and double-stained (C&S) specimens were prepared and photographed at The University of Kansas (Lawrence, Kansas, USA).

A total of 106 skeletal elements were coded based on the following conditions: absent (0), cartilaginous (1) and ossified (2) (Annexes 3 - 16). Skeletal elements from CT-scanned specimens were considered cartilaginous if not visible after the segmentation process and ossified if visible. Skeletal elements from C&S specimens were considered cartilaginous when Alcian blue was visible and considered ossified as soon as Alizarin red was retained. Paired elements were coded as one skeletal element. 3D models of the ethanol preserved specimens were observed in MeshLab (Cignoni *et al.* 2008) to code skeletal elements. Pictures of C&S specimens were observed in Fiji software (Schindelin *et al.* 2012) to code skeletal elements. Skeletal nomenclature is based on different authors for different anatomical units: the braincase (Sheil 2013; Wyneken 2001; Gray 2023), the splanchnocranium (Sheil 2013; Wyneken 2001), the dermatocranium and lower jaw (Sheil 2013; Gray 2023), the axial skeleton (Wyneken 2003), carapace and plastron (Spotila 2004), general appendicular skeleton (Sheil 2003), girdles (Wyneken 2001), and the flippers and hind limbs (Sheil 2003).

Multiple logistic regressions were used to determine the relationship between skeletogenesis and developmental stages (Fischer-Rousseau *et al.* 2009; Grünbaum *et al.* 2012). Assumptions were validated using visual examination of standard residuals and linearity between the independent variable and the logit transformation of the dependant variable. Goodness of fit of each model was evaluated using the area under the curve (AUC) of the receiver operating curve (ROC) (Zou *et al.*, 1997). The AUC values were between 0.79

and 0.99, which are acceptable following Hosmer *et al.* (1997). Chondrification and ossification of skeletal elements were selected to measure skeletogenesis. Miller's (1985) developmental stages (1-31) and field developmental stages (0-4) were both used separately as proxy of time (i.e., development). Multiple logistic regressions were applied to every bone coded, for both chondrification and ossification (Annexes 17 – 39). An analysis of dose-response curve was then applied to cumulate the number of cartilaginous and ossified elements according to both Miller's (1985) developmental stages and field developmental stages. When there was no overlap between 0 and 1 values on the x axis, the mean distance of the independent variable in the interval of values between 0 and 1 was taken as the DEV50. The cumulative curves were based on DEV50 values of skeletal elements. The package “drc (3.0-1)” (Ritz *et al.* 2015) was used for this analysis through R 4.2.2 (2022) and RStudio 2023.12.1+402 (2022).

A zero-inflated model was selected to determine the relationship between total embryonic mortality and nest conditions (solar exposition and distance to the high tide line). This model was chosen since the data set represents a count of dead embryos and therefore contains a high percentage of zeros. These relations between embryonic mortalities and environmental factors were used to evaluate the bias associated with the nesting site on mortalities per stages. The package “pscl (1.5.5.1)” (Zeileis *et al.* 2008) was used for the analysis through R 4.2.2 (2022) and RStudio 2023.12.1+402 (2022).

4. RESULTS

4.1 Chondrification and ossification sequences

Chondrification and ossification sequences are reconstructed based on 21 CT-scanned specimens, ranging from Miller's (1985) stages 26 to 31, and 24 C&S specimens, ranging from stages 23 to 31 (Annex 1).

At stage 23, like specimen KU 290507 (Figs. 4A, 4B), the skeletogenesis is mostly located in the cranium and axial skeleton. All the elements from the braincase (opisthotics,

prootics, supraoccipitals, basioccipitals, exoccipitals, basisphenoids, stapes), the pterygoids, the quadrates, the ribs and the vertebrae are present as cartilaginous precursors (Figs. 4A, 4B).

The appendicular skeleton starts to appear during stage 24, mostly in the anterior part. The pectoral girdle (acromia, scapulars, coracoids), the antero-proximal limb bones (humerus, radius, ulnas) and the manus bones (ulnares, pisiforms, intermedia, centrals 2 and 4, distal carpals 1 to 5, metacarpals 1 to 5, phalanges 1 to 5) are present as cartilaginous precursors. In the posterior part, the pelvic girdle (pubis, ilia, ischia) is cartilaginous. In the hyoid and branchial apparatus, the ceratohyals and ceratobranchials form as cartilages.

Ossification starts at stage 25. In the cranium, the parietals, squamosals, pterygoids, palatines and dentaries ossify. For the axial skeleton, the ribs and almost all plastron bones (epiplastrons, hyoplastrons, hypoplastrons, xiphoplastrons) ossify. The nuchal bone and the peripheral bones, from the carapace, and the entoplastron appear at this stage as cartilaginous precursors. As for the appendicular skeleton, the pectoral girdle (acromia, scapulars, coracoids) and the antero-proximal limb bones (humerus, radius, ulnas) ossify. The posterior limb bones (femurs, tibias, fibulas) and the pes bones (intermedia, fibulares, distal tarsals 1 to 5, metatarsals 1 to 5, phalanges 1 to 5) appear as cartilages.

Numerous elements ossify at stage 26. Like specimen KU 116907.5 (Figs. 5A, 5B), all the elements from the upper jaw, dermatocranium and palate (premaxilla, maxilla, prefrontals, frontals, postorbitals, jugals, quadratojugals, vomers) ossify (Figs. 5A, 5B). All the elements from the lower jaw (coronoids, angulars, surangulars, prearticulars, articulars) and the ceratobranchial bones also ossify (Figs. 5A, 5B). The neurocranium starts to present ossification since the basioccipitals, exoccipitals, basisphenoids and stapes are ossified (Figs. 5A, 5B). As for the axial skeleton, the cervical vertebrae, thoracic vertebrae, lumbar vertebrae, nuchal bone and entoplastron ossify (Figs. 5A, 5B). In the appendicular skeleton, the pelvic girdle (pubis, ilia, ischia) and posterior limb bones (femurs, tibias, fibulas) ossify

(Figs. 5A, 5B). Ossification also starts in the manus and pes at stage 26, including metacarpals 1 to 5, metatarsals 1 to 5 and some phalanges (Figs. 5A, 5B).

At stage 27, most of the skeletal elements are already ossified. Only the supraoccipitals, the sacral vertebrae and some manus and pes phalanges ossify.

The cranium ossification mostly ends at stage 28 with the opisthotics and prootics being ossified. The vertebral column ossification ends since the caudal vertebrae are ossified. The pisiform, in the manus, ossifies.

Stages 29 and 30 do not present new skeletogenic events. At stage 31, specimens, such as KU 116919 and KU 116913 (Figs. 4C, 4D, 5C, 5D), have reached their hatchling-like appearance. Skeletogenesis is mostly located in the manus and pes, as the ulnares, intermedia (manus), distal carpals 4 and 5, distal tarsals 4 and 5 and fibulares ossify (Figs. 4C, 4D, 5C, 5D). Some bones remain cartilaginous post-hatching. In the cranium, the ceratohyal bone is still cartilaginous at stage 31 (Figs. 4C, 4D, 5C, 5D). In the axial skeleton, the peripheral bones, of the carapace, are still cartilaginous (Figs. 4C, 4D, 5C, 5D). In the appendicular skeleton, the distal carpals 1 to 3, distal tarsals 1 to 3, centrals 2 and 4 and intermedia (pes) remain cartilaginous (Figs. 4C, 4D, 5C, 5D).

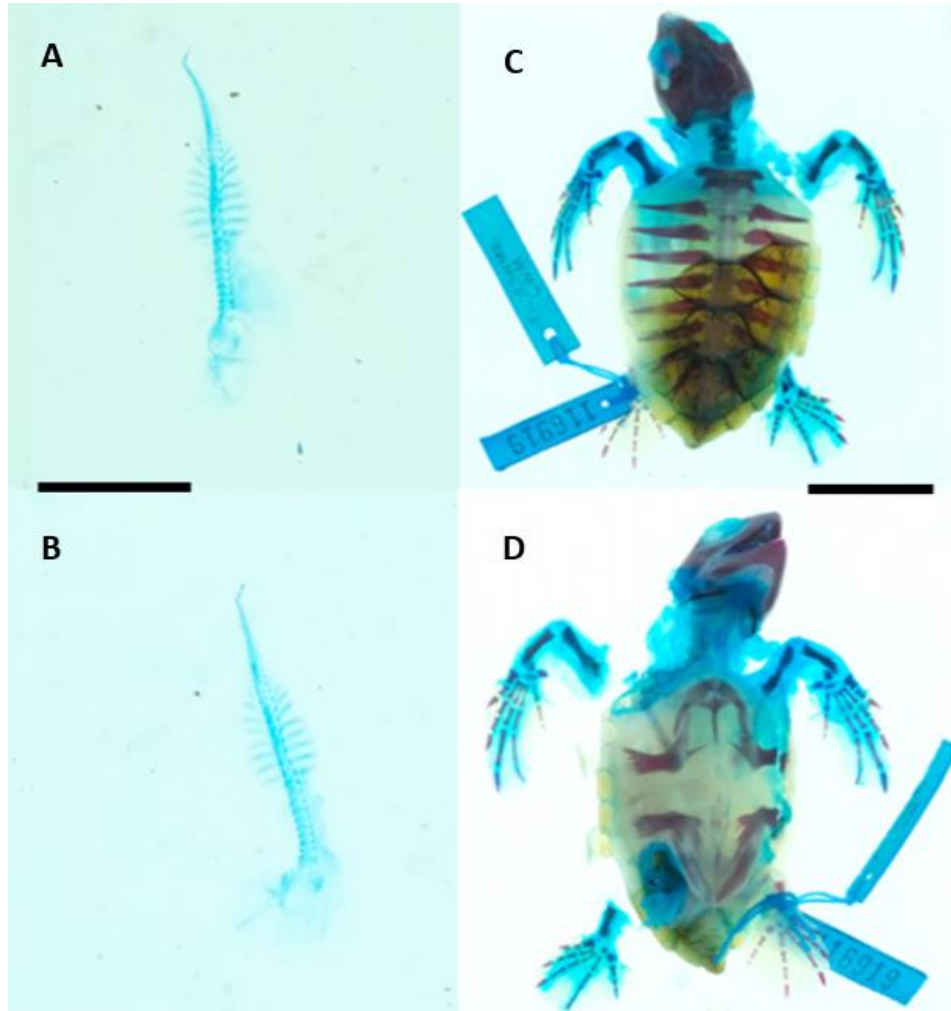


FIGURE 4. C&S specimens of *Eretmochelys imbricata*. A, B: Specimen KU 290507, stage 23, in dorsal (A) and ventral (B) view (file numbers: KUDA 013956 and KUDA 013957). C, D: Specimen KU 116919, stage 31, in dorsal (C) and ventral (D) view (file numbers: KUDA 013950 and KUDA 013951). Scale bar for A and B is 1 cm; scale bar for C and D is 2 cm. Pictures by Kier Pitogo, Biodiversity Institute of The University of Kansas.

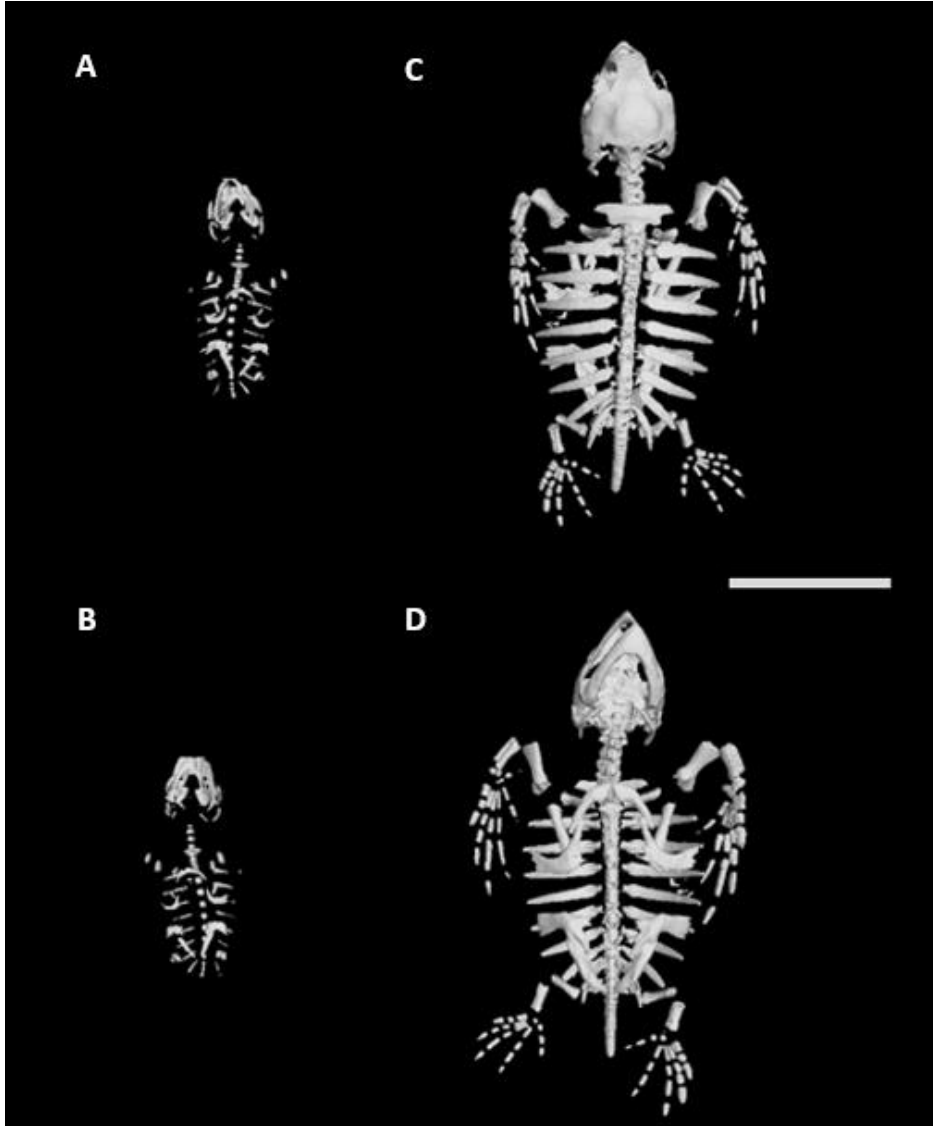


FIGURE 5. Micro-CT scan of *Eretmochelys imbricata* specimens. A, B: Specimen KU 116907.5, stage 26, in dorsal (A) and ventral (B) view. C, D: Specimen KU 116913, stage 31, in dorsal (C) and ventral (D) view. Scale bar is 3 cm.

Out of the 106 bones that were coded, 88 presented the cartilaginous condition while 96 presented the ossified condition. Cumulative number of cartilaginous and ossified skeletal elements provide more information on skeletogenesis in relation to Miller's (1985) developmental stages. The highest chondrification rate of skeletal elements occurs between

stages 23 and 24 (Fig. 6A). At stage 23, 15 elements are present while 83 are at stage 24 (Fig. 6A). All skeletal elements are present as cartilaginous precursors when embryos reach stage 26 (Fig. 6A). The highest ossification rate occurs between stages 25 and 26 (Fig. 6B). At stage 25, 25 structures are ossified while 61 are at stage 26 (Fig. 6B). All skeletal elements are ossified when embryos reach stage 31 (Fig. 6B). There is a rapid increase of both chondrification and ossification between stages 23 and 26, showing that most of the skeletogenesis occurs during that period. Stages 23 and 24 represent a developmental threshold for chondrification, while stages 25 and 26 represent a developmental threshold for ossification.

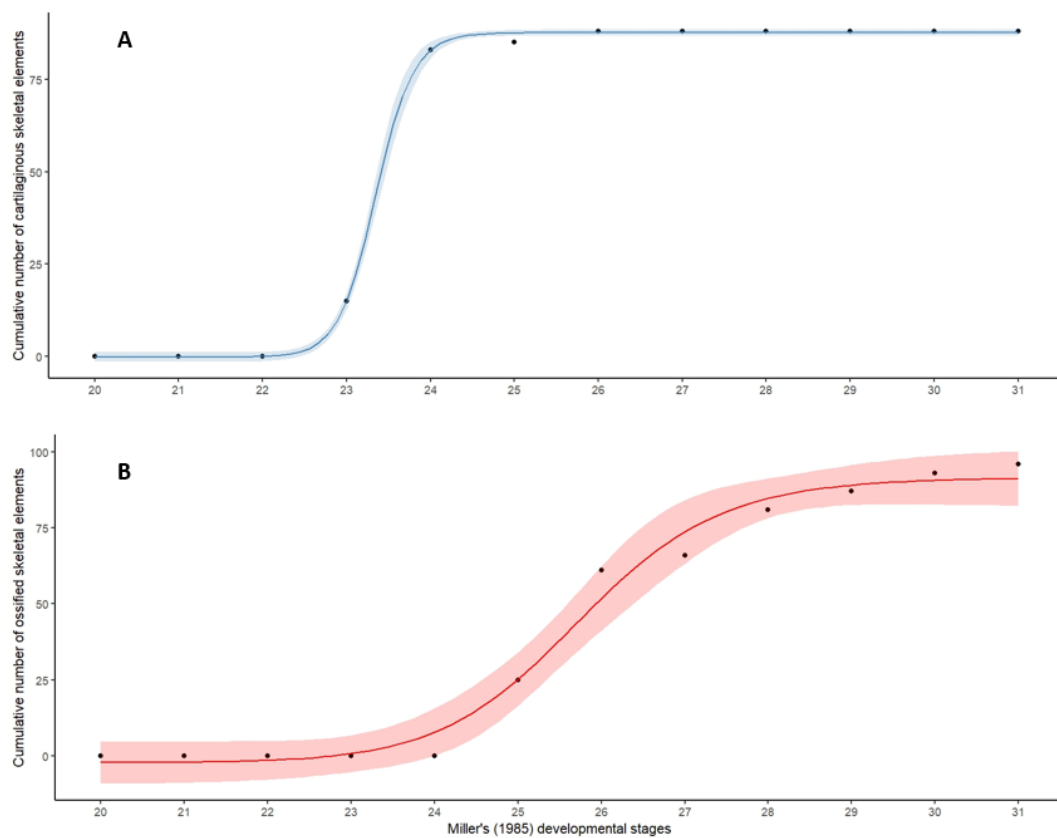


FIGURE 6. Skeletogenesis of *Eretmochelys imbricata* according to Miller's (1985) developmental stages. A: Cumulative number of cartilaginous skeletal elements. B: Cumulative number of ossified skeletal elements. The curves represent the dose response model and the shaded area represent the IC = 95% of the predicted values.

According to the developmental stages used in the field, the highest rates of chondrification and ossification both occurs between stages 1 and 2 (Fig. 7). For chondrification, 39 structures are present at stage 1 while 73 are at stage 2 (Fig. 7A). All skeletal elements are present as cartilaginous precursors when embryos reach stage 2 (Fig. 7A). No structures are ossified at stage 1 while 62 are at stage 2 (Fig. 7B). All skeletal elements are ossified when embryos reach stage 4 (Fig. 7B). There is a rapid increase in the cumulative number of elements between stages 1 and 2, showing that most of the skeletogenesis occurs during this period. Field developmental stages 1 and 2 represent a developmental threshold both for chondrification and ossification, respectively.

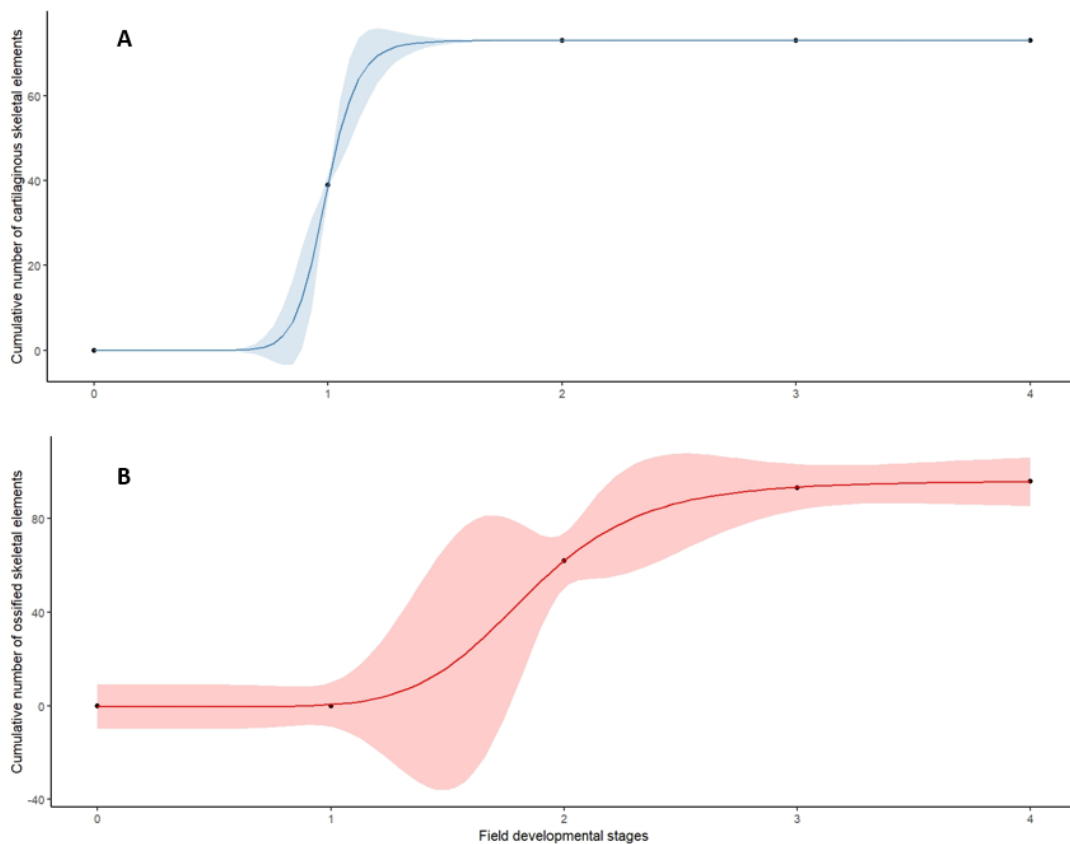


FIGURE 7. Skeletogenesis of *Eretmochelys imbricata* in relation to developmental field stages. A: Cumulative number of cartilaginous skeletal elements. B: Cumulative number of ossified skeletal elements. The curves represent the dose response model and the shaded area represent the IC = 95% of the predicted values.

4.2 Embryonic mortality

Embryonic mortality differs in relation to the field developmental stages. In total, 1547 mortalities were recorded in the 146 excavated nests of *E. imbricata* between 2014 and 2022. 59% of these mortalities occur during stage 0, representing the highest mortality of all stages (Fig. 8). Stage 1 has the second highest mortality with 17%, followed by stage 3 with 11 % (Fig. 8). Stage 4 represents 7% of the total number of mortalities, and stage 2 has the lowest number with 5% (Fig. 8).

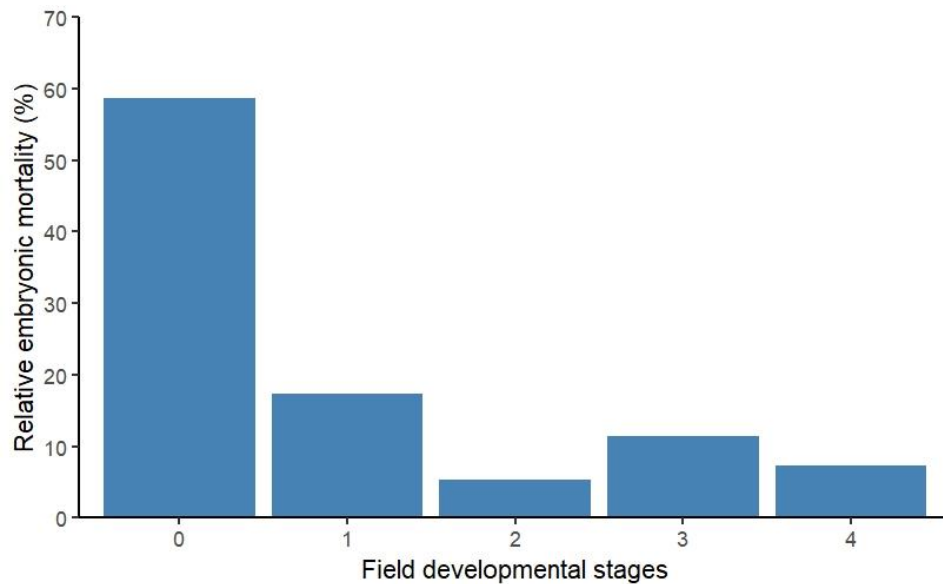


FIGURE 8. Relative embryonic mortality (%) in *Eretmochelys imbricata* according to field developmental stages. A total of 1547 mortalities were recorded.

Embryonic mortality varies according to the three sun exposure zones. The Border zone has the highest mortality with 44% of the 1547 mortalities recorded without taking into account the developmental stages of the embryos and juveniles (Fig. 9A). The Open zone accounts for 36% of the mortalities, whereas the Vegetation zone has the lowest mortalities with 20% (Fig. 9A). According to the count model (negbin with log link) and zero-inflated model (binomial with logit link) coefficients, there is a significant difference between the solar exposition zones as soon as there is at least one mortality recorded ($P < 0.001$). There is no significant difference when there is no mortality recorded ($P = 0.971$). This indicates

that embryos exposed to the sun are more prone to embryonic mortality than the ones under canopy cover. Relative embryonic mortality then differs in each zone according to the field developmental stages. There is a tendency that in any zone, the highest mortality rates are recorded in stage 0, then stage 1 and stage 3 (Fig. 9B). As for stage 2 and 4, there is a variation among zones. There is a higher mortality rate in stage 4 in the Open zone, but there is a higher rate in stage 2 in the Border and Vegetation zones (Fig. 9B). This indicates that younger embryos are generally more sensitive to sun exposure than older embryos.

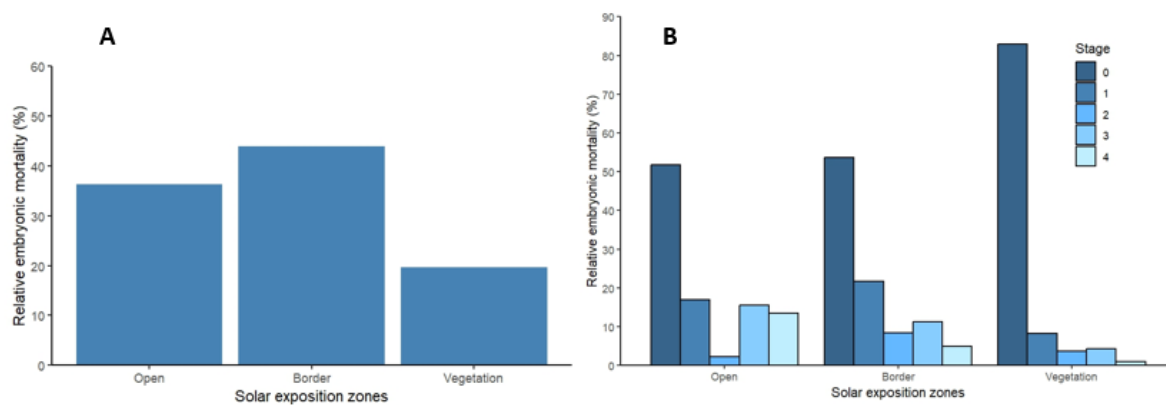


FIGURE 9. Relative embryonic mortality (%) in *Eretmochelys imbricata* according to solar exposition zones. A: Total mortality registered per zone. B: Mortality according to field developmental stages per zone. A total of 1547 mortalities were recorded.

Relative embryonic mortality differs according to the distance of the nest from the high tide line. Without taking into account the field developmental stages, the most mortalities recorded were in distances between 10 m and 20 m with 50% of the 1547 mortalities (Fig. 10A). 27% of the mortalities recorded were in distances under 10 m and 22% for between 20 m and 30 m (Fig. 10A). There is only 1% of the total mortality that was recorded between 30 and 40 m (Fig. 10A). No mortalities were recorded over 40 m from the high tide line (Fig. 10A). According to the count model (negbin with log link) and zero-inflated model (binomial with logit link) coefficients, there is a significant difference between the distances to the high tide line as soon as there is at least one mortality recorded ($P < 0.001$). There is no significant difference when there is no mortality recorded ($P = 0.396$).

This indicates that embryos closer to the high tide line are more prone to embryonic mortality than those further. Mortalities recorded in the distance classes differ according to the field developmental stages. There is a tendency that in any distance class, the highest mortalities were recorded in stage 0 and the lowest in stage 4 (Fig. 10B). In small distances, there are more mortalities in stage 1 and, as it goes further, stage 2 and stage 3 get higher (Fig. 10B). This indicates that younger embryos are more prone to be affected by the distance to the high tide line than older embryos.

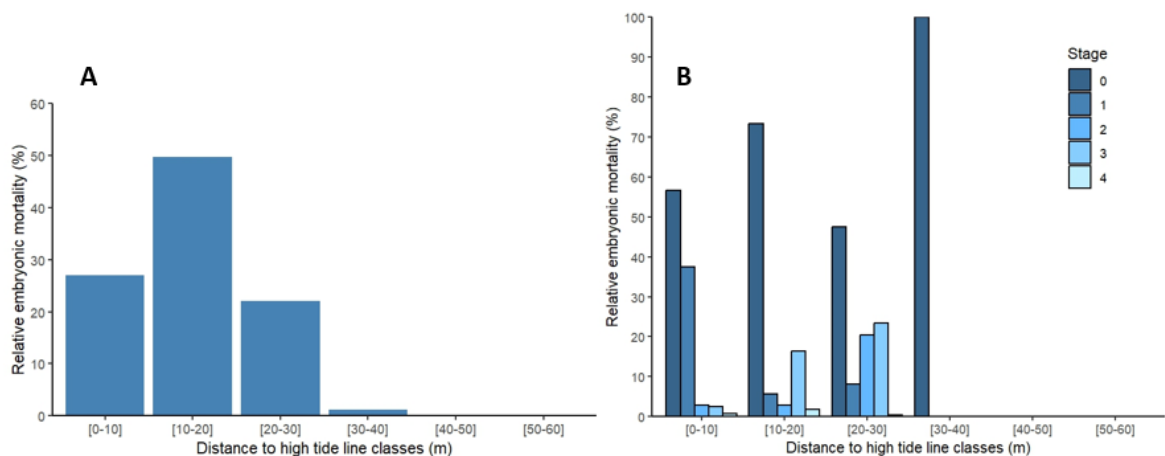


FIGURE 10. Relative embryonic mortality (%) in *Eretmochelys imbricata* according to the distance to the high tide line (m). A: Total mortality registered per class. B: Mortality according to field developmental stages per class. A total of 1547 mortalities were recorded.

5. DISCUSSION

Chondrification and ossification sequences of *E. imbricata* show a relationship between skeletal development, critical periods and embryonic mortalities. Clear tendencies were observed of the mortalities recorded in the field according to the developmental stages, both Miller's (1985) and field developmental staging. Stage 0 has the most mortalities out of all field developmental stages. This stage generally presents more than half of the mortalities recorded, even by considering environmental factors such as sun exposure and distance to the high tide line. However, these mortalities are probably not related to skeletogenesis but

mostly to the nest environment (Bell *et al.* 2004; Bishop *et al.* 1991; Soslau *et al.* 2011). During field developmental stage 0 (Miller's (1985) stages 6 to 19), embryos are highly vulnerable to their surroundings since it represents the moment after oviposition (Bell *et al.* 2004; Miller *et al.* 2017). The environmental changes from the female reproductive system to the nesting site on the beach cause a lot of stress on embryos (Bell *et al.* 2004). Since they are in close contact with the environment in their incubation chamber, embryos are prone to be affected by contaminants and bacteria located in the nesting site (Bell *et al.* 2004; Bishop *et al.* 1991; Soslau *et al.* 2011). The nest is also in a highly variable environment with physicochemical parameters that are subject to sudden change, as shown with the solar exposition and distance to the high tide line data (Sheil 2013; Ackerman *et al.* 1985; Packard and Packard 1984). Earlier stages are then in a critical period of adaptation to the new environment, making them highly vulnerable to external or internal stress factors (Bell *et al.* 2004). This could explain why 52 % of all mortalities recorded are during stage 0. Furthermore, skeletogenesis is not likely to have caused these mortalities since there is not enough skeletal elements formed in these early stages (Sheil 2003). There are 39 structures that are developed in cartilaginous form during stage 0. The appearance rate is then quite slow, since stage 0 regroups 14 developmental stages (Miller 1985). It is unlikely that the development of these few elements, with this appearance rate, could increase embryos vulnerability (Carrier and Leon 1990). However, this hypothesis is not validated because no embryos younger than stage 23 were observed and coded.

Field developmental stage 1 has the second highest mortality rates recorded. There is a clear tendency that even by including environmental factors, stage 1 generally presented more mortalities than the other stages. These mortalities could be indirectly linked to skeletal growth, since stage 1 has the highest chondrification rate of skeletal elements. Based on Bell *et al.* (2004), Miller's (1985) stages 20 to 24 (field developmental stage 1) represent a critical period in embryos' development. This period is known for being the temperature sex determination moment, affecting greatly the physiology of embryos (Bell *et al.* 2004; Yntema and Mrosovsky 1982). Embryos are then highly vulnerable to their environment, making

them subject to permanent morphological changes due to stress (Bell *et al.* 2004; Yntema and Mrosovsky 1982). This period is also known for having a strong organogenesis (Bell *et al.* 2004). The highest chondrification rate of skeletal structures occurs between stages 23 and 24, making field developmental stage 1 the stage with the most rapid growth of the skeletogenesis which is an important part of organogenesis. As proven in many studies, rapid growth is a limiting factor of the skeletal system (Carrier and Leon 1990; Currey and Butler 1975; Torzilli *et al.* 1982; Bonfield and Clark 1973). Immature bones, those that are rapidly growing, have a different composition and mechanical behavior than mature bones with low density, low mineral content and a cancellous matrix (Carrier and Leon 1990; Szabo *et al.* 2024; Torzilli *et al.* 1982). Due to these characteristics, rapid growth results in skeletal tissues that are highly vulnerable to stress and, therefore, subject to deformation (Carrier and Leon 1990; Szabo *et al.* 2024). Since the development of an embryo relies on multiple physiological processes, the disruption of one of them could be fatal (Bell *et al.* 2004). Consequently, according to our results, it is possible to suggest that the high vulnerability of the skeletal system during embryonic stages 20 to 24 could be a limiting factor leading to embryonic mortality.

Field developmental stages 2, 3 and 4 present variable mortality rates and show no clear tendencies, even by considering environmental factors. For stage 2 (Miller's (1985) stages 25 and 26), there is an opposite relation between skeletal development and mortalities than what was observed in field developmental stage 1. The highest ossification rate occurs between stages 25 and 26, making stage 2 the stage with the most ossification process. However, this stage presents, in general, the least number of embryonic mortalities. At this point, skeletogenesis is slowed since most of the skeletal elements are already present and ossification process has begun. The composition and the mechanical properties of the skeletal tissues change, resulting in bones with a higher resistance to stress and deformation than at field developmental stage 1 (Torzilli *et al.* 1982; Szabo *et al.* 2024). Embryos are then less vulnerable to external and internal stress factors. This shows that ossification, unlike chondrification, does not seem to be a limiting factor that could lead to embryonic mortality.

For stages 3 and 4 (Miller's (1985) stages 27 and 28 and stages 29 to 31 respectively), skeletogenesis does not seem to impact embryonic mortality. At these stages, the development of the skeleton is almost done since for both chondrification and ossification the asymptote is reached. All skeletal elements included in this study are present at stage 26 (field developmental stage 2), so before stages 3 and 4. This means that chondrification could not possibly lead to embryonic mortality for these stages. As for ossification, most of the skeletal elements are ossified when reaching stage 31 and only a few remain in cartilage. Even if this process is still involved during stages 3 and 4, it does not seem to impact embryonic mortality as previously described with field developmental stage 2.

6. CONCLUSION

Chondrification and ossification patterns obtained from both CT-scanned and C&S specimens of *E. imbricata* help to improve the precision of the standard developmental staging of sea turtles. By quantifying the patterns, it was possible to establish that the highest chondrification rate was between stages 23 and 24 (field stage 1), and that the highest ossification rate was between stages 25 and 26 (field stage 2). There are then two developmental thresholds in the skeletogenesis of sea turtles. By combining those results with the mortality data, it is suggested that skeletogenesis represents a potential indirect cause of natural embryonic mortality between stages 20 and 24 (field stage 1). The rapid increase of skeletal elements, represented by a developmental threshold between stages 23 and 24, seems to be associated with the embryonic vulnerability to external and internal stress factors, leading to a higher mortality risk. These results not only improve the characterization of the developmental stages, but also provide a useful conservation tool to protect embryos during their most vulnerable stages.

Further studies could be beneficial to understand the role of skeletal development as a limiting factor. An energy consumption study, or metabolic rate, could properly differentiate the impact of chondrification *versus* ossification, and rapid growth *versus* slow

growth. Obtaining these results would be essential to better understand the physiological processes behind embryonic mortality and to plan and implement appropriate conservation measures. These measures could be, for example, to add a cover to the nests to avoid long sun exposure and to install a breakwater in front of those that are too close to the high tide line.

7. ACKNOWLEDGMENTS

This article was written as M. Sc. thesis (LR) under the supervision of Richard Cloutier, at the Université du Québec à Rimouski (UQAR). We thank Anna Motta and Kier Pitogo, from the Biodiversity Institute of The University of Kansas, for the loan and the pictures of the specimens. We thank Terry Grande, Claudia Kern and Anne Latuska, from Loyola University Chicago, for the CT-scans. We also thank Charlotte Foale, Marika Breton and Alex Lascher-Posner from the Cano Palma Biological Station (COTERC), for the access to the embryonic mortality data. Data collection permit at Cano Palma was given by the Sistema Nacional de Areas de Conservacion de Tortugero (permit number: SINAC-ACTo-DIR-RES-028-2023). We thank the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) Discovery Grant (RC) as a funding source.

CONCLUSION GÉNÉRALE

1. RETOUR SUR LES RESULTATS

Notre étude portait sur l'impact du développement squelettique sur la mortalité embryonnaire d'*Eretmochelys imbricata*, une espèce de tortue de mer faisant partie de la famille des Cheloniidés. Dans un premier temps, les patrons de chondrification et d'ossification des os crâniens et postcrâniens ont été déterminés en fonction des stades de croissance. Par la suite, le développement squelettique a été évalué comme étant un potentiel facteur indirect de mortalité embryonnaire d'*E. imbricata*.

En ce qui concerne les séquences de squelettogenèse, il a été possible d'établir deux nouveaux seuils développementaux pour *E. imbricata*. Le plus haut taux de chondrification se trouve entre les stades 23 et 24 de Miller (1985), représentant le stade 1 utilisé sur le terrain. Cela signifie qu'il existe un seuil développemental entre ces deux stades au niveau de la chondrification du squelette. Le plus haut taux d'ossification se trouve entre les stades 25 et 26 de Miller (1985), soit le stade 2 utilisé sur le terrain. Il s'agit d'un seuil développemental entre ces deux stades au niveau de l'ossification du squelette. Ces données pourraient être utilisées pour mieux différencier ces stades dans leur caractérisation actuelle.

Pour ce qui est des données de mortalité embryonnaire, avec l'inclusion des paramètres environnementaux (exposition au soleil et distance à la ligne de marée haute), il a été possible de déterminer que le plus haut taux de mortalité est retrouvé au stade 0, soit le stade étant le plus vulnérable à son environnement. Ensuite, le stade 1 présente le deuxième plus haut taux de mortalité retrouvé en milieu naturel. Les taux de mortalité retrouvés aux stades 2, 3 et 4 varient selon les paramètres environnementaux étudiés.

En combinant les données de mortalité aux patrons de croissance obtenus, il est possible de déterminer que le développement du squelette représente une cause indirecte de mortalité embryonnaire entre les stades 20 à 24 de Miller (1985), soit le stade 1 utilisé sur le terrain. La croissance rapide des structures osseuses, notamment entre les stades 23 et 24,

augmente la vulnérabilité des embryons face aux facteurs de stress internes et externes, menant à un plus haut risque de mortalité embryonnaire.

2. ORIGINALITE DE L'ETUDE

L'originalité de la présente étude reposait principalement sur deux aspects : considérer le développement squelettique comme une cause potentielle de mortalité embryonnaire, ainsi que de caractériser les patrons de chondrification et d'ossification avec des courbes cumulatives de régressions logistiques.

La mortalité embryonnaire chez les tortues de mer est un phénomène étudié depuis longtemps dans la communauté scientifique (Bell *et al.*, 2004 ; Whitmore et Dutton, 1985 ; Bladow et Milton, 2019). Le phénomène est principalement étudié d'un point de vue environnemental en considérant les facteurs externes à l'embryon comme causes potentielles de mortalité, notamment la température et les conditions hydriques (Bell *et al.*, 2004 ; Whitmore et Dutton, 1985 ; Bladow et Milton, 2019). Toutefois, malgré une compréhension des impacts de l'environnement sur le développement des embryons, les mécanismes physiologiques derrière la mortalité embryonnaire restaient encore inconnus (Bell *et al.*, 2004). En considérant le développement squelettique comme cause potentielle de mortalité embryonnaire, il a été possible de comprendre le rôle des facteurs internes sur la survie des embryons. Il s'agirait alors d'une combinaison de stress intrinsèques et extrinsèques qui engendrerait de la mortalité embryonnaire, puisque le développement squelettique en soi, à certains stades de croissance, rend l'embryon plus vulnérable à son environnement. La combinaison d'une croissance affaiblissante et de facteurs environnementaux non optimaux est la réponse principale aux causes de mortalité embryonnaire.

Les patrons de chondrification et d'ossification des tortues de mer ont été décrits de nombreuses fois dans la littérature, spécialement sous forme descriptive (Sheil, 2003 ; Sheil, 2013 ; Rieppel, 1993). Les études menées utilisent notamment des représentations imagées des structures osseuses pour décrire la croissance squelettique, permettant d'avoir un visuel

sur les changements de forme et de composition au cours du développement (Sheil, 2003 ; Sheil, 2013 ; Rieppel, 1993). Toutefois, cette méthode descriptive ne permet pas d'avoir une vue d'ensemble quantitative sur le développement des structures osseuses. Notre étude, en utilisant des courbes cumulatives de régressions logistiques pour représenter les patrons de chondrification et d'ossification, a permis de quantifier le développement squelettique en suivant les stades de croissance. Il a été possible de déterminer non seulement les changements de forme et de composition de chaque os au cours du développement, mais également le nombre cumulatif de chondrification et d'ossification de structures par stade de croissance. Cette méthode d'analyse apporte donc plus d'information quant aux patrons de chondrification et d'ossification que ce qui a préalablement été fait dans la littérature.

3. LIMITES DE L'ETUDE

Malgré le fait que cette étude présente des résultats prometteurs, celle-ci comporte tout de même certaines limites associées à la méthodologie. La taille des échantillons, la méthode et l'effort d'échantillonnage, la méthode d'analyse des spécimens diaphanisés ainsi que la mesure de l'effet de la croissance squelettique étaient des facteurs sujets à beaucoup de variation. Toutefois, ces différentes limites ne remettent pas en question les résultats obtenus et représentent seulement des voies d'amélioration possibles pour les futures études sur le sujet.

La taille des échantillons, soit le nombre de nids par catégorie de facteurs environnementaux (zones d'exposition au soleil et distances à la ligne de marée haute), était très variable puisque les tortues de mer choisissent de façon majoritairement aléatoire leur site de ponte (Hays *et al.*, 1995 ; Wood et Bjorndal, 2000). Il n'y avait pas de traitement appliqué sur la plage pour contrôler la sélection des sites de ponte, faisant en sorte que le nombre de nids par catégorie dépendait uniquement des femelles nicheuses. Le fait que la taille de l'échantillon variait en fonction des différentes catégories pourrait avoir influencé les résultats des tendances de mortalité embryonnaire.

La méthode et l'effort d'échantillonnage, en ce qui concerne les données de mortalité, étaient également très variable puisque celles-ci s'étendent de 2014 à 2022. Les équipes de terrain ainsi que les protocoles d'excavations et de prises de données ont considérablement variés au cours des années. Puisque l'équipe de terrain changeait souvent, il y avait un manque d'uniformité au niveau de la prise de données, faisant en sorte qu'il y avait parfois des données manquantes. Certains nids ont donc dû être enlevés des analyses par manque d'information. De plus, certains décomptes, tels que le nombre de mortalités par stade de développement, étaient subjectifs à l'équipe en place. Avec l'utilisation de critères visuels pour l'identification des stades, il pouvait y avoir une perception différente de ceux-ci, rendant ces données plutôt subjectives. Les protocoles ayant également changé à travers les années, la méthode d'excavation n'a pas été constante, ce qui a mené encore une fois à un manque d'uniformité au niveau de la prise de données.

La méthode d'analyse des spécimens diaphanisés était également une source de biais. Puisqu'il était impossible d'importer les spécimens au Canada, s'agissant d'une espèce en danger critique d'extinction, les spécimens diaphanisés ont été observés seulement par photographie. Le codage des éléments squelettiques a donc pu être affecté par cette méthode.

En ce qui concerne l'effet du développement squelettique sur la mortalité embryonnaire, aucune mesure directe de l'effet n'a été utilisée dans le cadre de l'étude pour supporter les résultats obtenus.

4. PERSPECTIVES

L'étude des causes de mortalité embryonnaire, surtout au niveau du développement même de l'embryon, est très importante en matière de conservation des tortues de mer. Étant des espèces vulnérables ou en danger d'extinction, ce type d'étude permet une meilleure compréhension de ces organismes dans un but de conservation, notamment puisque le taux de survie d'une tortue de l'état embryonnaire jusqu'à l'âge adulte est estimé à 1 sur 1000 (Frazer, 1992). En étudiant les causes de mortalité embryonnaire probables, il est possible de

définir les périodes critiques du développement, les processus physiologiques impliqués ainsi que l'effet de l'environnement du site de ponte. Toutes ces données permettent alors de dresser un portrait des facteurs d'incubation optimaux, que les agents de conservation peuvent utiliser comme outil sur le terrain.

Dans le cas du développement squelettique, les résultats de notre étude démontrent que la période durant laquelle les embryons seraient plus vulnérables se situe entre les stades 20 à 24 de la littérature (Miller *et al.*, 2017 ; Miller, 1985). Correspondant aux jours 12 à 36 d'incubation, en fonction de la température environnante, il serait alors possible d'instaurer des mesures de conservation pour cette période du développement afin de maximiser les chances de survie des embryons (Miller *et al.*, 2017). Ces mesures pourraient être, par exemple, d'offrir un meilleur couvert aux nids pour éviter l'exposition prolongée au soleil et d'installer un brise-lame devant les nids situés près de la ligne de marée haute.

Plus d'études seraient nécessaires pour mieux comprendre les mécanismes physiologiques derrière la mortalité embryonnaire. Nos résultats amènent une réponse préliminaire au rôle du développement squelettique sur le taux de mortalité embryonnaire, mais une recherche plus approfondie serait bénéfique. Conduire une étude de consommation énergétique, ou de taux métabolique, permettrait de différencier l'effet de la chondrification *versus* l'ossification des structures squelettiques, ainsi que de la croissance rapide du système *versus* la croissance lente. Obtenir ses informations permettrait de préciser les résultats obtenus, en plus de fournir de nouvelles pistes d'outils de conservation adaptés aux processus physiologiques affectés.

ANNEXES

Annex 1 : Specimens examined from the herpetology collection of the Biodiversity Institute of The University of Kansas (Lawrence, Kansas, USA). All specimens were collected by Charles W. Myers on October 21st 1966 from Isla Escudo de Veraguas, Bocas del Toro province, Panama. Embryos were taken from a lot of eggs on a narrow beach approximately 12 feet (ca. 4m) from high tide line. The nest was approximately 2 feet deep (ca. 60 cm).

Specimen ID	Specimen Type	Field Stage	Miller's (2017) Stage	Total Length (cm)	Carapace Length (cm)
116916	Cleared and double-stained	4	31	6.78	4.48
116917	Cleared and double-stained	4	31	6.88	4.44
116918	Cleared and double-stained	4	31	6.91	4.33
116919	Cleared and double-stained	4	31	7.08	4.46
116920	Cleared and double-stained	4	31	6.53	4.10
290506	Cleared and double-stained	1	24	1.94	0.95
290507	Cleared and double-stained	1	23	1.79	0.84
290508	Cleared and double-stained	1	23	1.79	0.85
290509	Cleared and double-stained	2	25	4.37	2.73
290510	Cleared and double-stained	2	26	4.36	2.52
290511	Cleared and double-stained	2	26	4.61	2.73
290512	Cleared and double-stained	3	27	6.06	3.72
290513	Cleared and double-stained	3	28	6.02	3.74
290514	Cleared and double-stained	3	27	5.73	3.74
290515	Cleared and double-stained	3	28	5.22	3.21
290516	Cleared and double-stained	1	24	2.39	1.18
290517	Cleared and double-stained	2	25	3.00	1.87
290518	Cleared and double-stained	2	25	NA	NA
290519	Cleared and double-stained	2	26	4.82	3.00
290520	Cleared and double-stained	3	27	5.54	3.60
290521	Cleared and double-stained	3	28	5.70	3.45
116907_1	Ethanol preserved	3	27	5.00	3.07
116907_2	Ethanol preserved	3	28	5.82	3.84
116907_3	Ethanol preserved	3	28	5.42	3.82
116907_4	Ethanol preserved	3	27	5.32	3.29
116907_5	Ethanol preserved	2	26	4.57	2.92
116907_6	Ethanol preserved	3	28	5.51	3.66

116907_7	Ethanol preserved	3	28	5.66	3.65
116907_8	Ethanol preserved	3	28	5.85	3.39
116907_9	Ethanol preserved	3	29	6.49	3.97
116908	Ethanol preserved	4	31	6.20	3.84
116909	Ethanol preserved	4	31	7.00	4.34
116910	Ethanol preserved	4	31	6.40	3.97
116911	Ethanol preserved	4	31	6.10	3.78
116913	Ethanol preserved	4	31	7.00	4.34
116914	Ethanol preserved	4	31	6.50	4.03
116921	Ethanol preserved	4	31	7.10	4.40
116922	Ethanol preserved	4	31	6.80	4.22
116923	Ethanol preserved	4	31	6.50	4.03
116924	Ethanol preserved	4	31	6.60	4.09
116925	Ethanol preserved	4	31	7.00	4.34
116926	Ethanol preserved	4	31	6.50	4.03
129719_1	Ethanol preserved	3	27	NA	NA
129719_2	Ethanol preserved	3	27	NA	NA
347167	Ethanol preserved	3	27	5.00	3.10

Annex 2 : Nests and mortality data from Cano Palma Biological Station, Tortuguero, Costa Rica, from 2014 to 2022. Data collection permit given by the Sistema Nacional de Areas de Conservacion de Tortuguero. Permit number : SINAC-ACTo-DIR-RES-028-2023.

Year	Nest ID	HTL	Zone	GPS E	GPS N	Stage 0	Stage 1	Stage 2	Stage 3	Stage 4	Total Mortality
2014	CP14004	15.51	B								
2014	CP14019	30.85	B								0
2014	CP14063		B								
2014	CP14055	9.68	B			4	0	0	0	0	2
2014	CP14079	20.12	B			6	0	0	0	0	3
2014	CP14015	8.05	O								
2014	CP14042	14.10	O								
2014	CP14146	47.90	O								
2014	CP14018	8.99	V			0	0	0	0	0	0
2014	CP14036	27.72	V			7	0	1	0	1	5
2014	CP14083	12.61	V			125	0	0	0	0	0
2014	CP14152	31.82	V								
2015	CP15013	33.90	B			0	0	0	0	0	0
2015	CP15017	7.96	B								
2015	CP15029	6.40	B			0	0	0	0	0	0
2015	CP15032	3.33	B			0	0	0	0	0	0
2015	CP15067	7.39	B			0	0	0	0	0	0
2015	CP15104	10.10	B			9	1	0	0	0	2
2015	CP15133	21.70	B			0	0	0	0	0	0
2015	NTRI15044		B	223213	1173500	4	1	0	1	0	2

2015	CP15026	0.81	O							
2015	CP15035	19.84	O			0	0	0	0	0
2015	CP15031	15.20	O			7	0	0	0	3
2015	CP15112	12.70	O							
2015	CP15015	12.05	V			17	0	0	0	0
2015	CP15027	5.80	V			3	1	0	1	2
2015	CP15040	17.22	V			9	2	4	5	11
2015	CP15061	5.70	V			0	0	0	0	2
2015	NTRI15043		V	223121	1173731	0	0	0	0	0
2016	CP16003	16.20	B	223299	1173293	0	0	0	0	0
2016	CP16005	10.25	B	223368	1173126					
2016	CP16007	16.90	B	223390	1173080					
2016	CP16016	16.60	B	223493	1172837					
2016	CP16011	23.16	B	222040	1176373	0	0	0	0	0
2016	CP16021	17.20	B	223264	1173368					
2016	CP16022	26.06	B	222035	1176371					
2016	CP16023	17.10	B	223161	1173621	8	0	0	0	0
2016	CP16033	16.11	B	222615	1174954	10	3	0	0	4
2016	CP16018	14.40	O	222129	1176147	0	0	0	0	0
2016	CP16089	0.50	O	223465	1172898	10	85	0	0	85
2016	CP16092	21.60	O	222712	1174659	3	0	0	0	0
2016	CP16012	9.09	V	223551	1172696	0	0	0	0	0
2016	CP16017	21.55	V	222827	1174396	32	0	0	1	2
2017	NTRI17002		B	222493	1175243	7	5	1	1	7
2017	NTRI17045		B	222150	1176105	1	0	0	0	0
2017	NTRI17001		O	222059	1176352	11	2	0	0	2
2017	NTRI17007		O							
2017	NTRI17012		O	222748	1174646	4	0	0	2	68
2017	NTRI17024		O	223639	1172471	9	1	1	1	23
2017	NTRI17060		O	222615	1174977	9	2	1	7	19
2017	NTRI17064		O	223077	1173840	0	0	0	0	0
2017	NTRI17004		V	222464	1175318	23	0	1	1	3
2018	CP18028	25.70	B	222888	1174225					
2018	CP18020	3.89	B	222033	1176388					2
2018	CP18026	22.64	B	222634	1174917					
2018	NTRI18021		B	223589	1172599	2	0	0	0	0
2018	CP18011	21.64	O							
2018	CP18015	18.12	O	222642	1174922					
2018	CP18013	27.20	O	221090	1176740					
2018	CP18029	21.45	O							
2018	CP18024	10.72	O	222588	1175028					
2018	CP18031	9.60	O	222406	1175492	2	0	0	0	0
2018	NTRI18002		O	222220	1175934	2	0	0	1	1
2018	NTRI18016		O	222701	1174776	0	0	0	0	0
2018	NTRI18030		O	222768	1174567	1	0	0	0	0
2018	CP18018	25.00	V							
2018	CP18017	21.26	V							
2018	CP18022	4.21	V	222709	1174690	18	20	4	3	27
2018	NTRI18024		V	223186	1173552	4	0	0	0	0
2019	CP19008	23.75	B	222016	1176432					
2019	CP19011	23.40	B	222248	1175862					
2019	CP19019	22.52	B	222115	1176194	0	0	0	0	0
2019	CP19026	12.92	B	222524	1175174					
2019	CP19029	4.50	B	223303	1173287					
2019	CP19075	7.88	B	223597	1172555	1	0	0	0	2
2019	CP19095	15.50	O	222776	1174567	8	0	0	0	0
2019	CP19099	15.70	O	222575	1175069	8	0	2	1	3

2019	NTRI19033		O	222587	1175031	0	0	0	0	0	0
2019	NTRI19045		O	222151	1176142	1	0	0	0	0	1
2019	NTRI19124		O	222654	1174869	0	0	0	0	0	0
2019	CP19009	12.63	V	223692	1172297						
2019	CP19012	13.29	V	223618	1172510	1	0	0	0	0	0
2019	CP19013	8.10	V	223574	1172614						
2019	CP19015	10.33	V	223610	1172527						
2019	CP19016	9.85	V	223578	1172853						
2019	NTRI19043		V	223137	1173680	0	0	0	0	0	4
2020	CP20002	5.40	O	223124	1173720	89	0	0	0	0	0
2021	CP21007	29.00	B	222194	1175967	18	13	46	49	0	108
2021	CP21034	17.69	B	221997	1176562	7	7	0	1	1	9
2021	CP21025		B	222698	1174774	8	0	1	7	14	22
2021	CP21040	5.30	B	223578	1172594	28	0	4	3	2	10
2021	CP21047		B	222947	1174136	9	0	0	1	4	5
2021	CP21045		B	223000	1173982	76	51	0	7	6	64
2021	CP21052	14.63	B	222645	1174882	25	16	2	4	0	22
2021	CP21039	19.20	B	222372	1175551	77	0	0	0	1	1
2021	CP21070	27.00	B	222803	1174473	2	1	0	1	0	2
2021	CP21078	11.40	B	223523	1172752	0	0	0	0	0	0
2021	CP21245		B	223383	1173061	0	0	0	0	0	85
2021	CP21072	19.25	B	223332	1173190	0	0	0	0	3	3
2021	CP21146	20.30	B	223138	1173688	3	0	0	1	0	1
2021	CP21108	12.10	B	223001	1173976	6	0	3	0	2	5
2021	CP21203	18.45	B	223239	1173436	0	0	0	0	0	0
2021	CP21189	20.60	B	223268	1173349	3	1	0	0	0	1
2021	CP21187	28.45	B	223625	1172489	1	0	0	0	0	0
2021	CP21019	9.20	O	222139	1176173	6	1	0	0	0	161
2021	CP21015	13.70	O	223281	1173335	1	0	0	0	0	0
2021	CP21022	14.80	O	222044	1176424	8	1	2	4	0	9
2021	CP21026	13.20	O	222319	1175702	56	0	0	70	1	72
2021	CP21064	13.50	O	222176	1176043	3	0	2	0	0	2
2021	CP21035		O	222664	1174829	0	0	0	0	0	0
2021	CP21055	26.80	O	222809	1174461	1	1	0	0	0	5
2021	CP21065		O	222737	1174640	28	2	3	0	0	5
2021	CP21066		O	222349	1175616	5	0	0	0	1	1
2021	CP21136	16.80	O	222831	1174430	0	0	0	0	0	0
2021	CP21143	18.36	V	223022	1173935	0	0	0	0	0	1
2021	CP21214	26.10	V	223164	1173602	1	0	0	1	0	8
2022	NTRI22008		B	222673	1174832	0	0	0	0	0	0
2022	CP22040	24.40	B	222053	1176347	0	0	0	0	0	0
2022	CP22034	19.90	B	223093	1173791	0	0	0	0	0	0
2022	CP22040	24.40	B	222053	1176347	5	0	0	0	0	0
2022	CP22061		B	222281	1175717	24	48	0	0	0	48
2022	CP22049	10.30	B	222312	1173728						
2022	CP22076	25.50	B	222730	1174659	0	0	0	0	0	0
2022	CP22208	36.00	B	223644	1172431	0	0	0	0	0	0
2022	CP22531	24.00	B	222187	1176038	1	1	0	1	0	6
2022	NTRI22085		B	223053	1173864	8	0	0	0	0	0
2022	CP22441	35.00	B	223061	1173892	1	0	0	0	0	0
2022	CP22517	33.00	B	223179	1173587	3	0	0	0	0	0
2022	CP22694	38.00	B	222979	1174043	8	0	0	0	0	0
2022	CP22006		O	222724	1174718	0	0	0	0	0	0
2022	CP22035	54.70	O	221954	1176534	0	0	0	0	0	0
2022	CP22019		O	223473	1172872	0	0	0	0	0	3
2022	CP22028	27.00	O	222120	1176215	0	0	0	0	0	0
2022	NTRI-015		O	222188	1176046	0	0	2	0	0	2

2022	CP22032	14.50	O	222679	1174817	1	0	0	1	0	1
2022	CP22043	15.10	O	223547	1172694						
2022	CP22072	30.64	O	222663	1174856	0	0	0	0	0	0
2022	CP22050	4.20	O	222455	1175197	1	0	0	0	0	0
2022	CP22095	22.15	O	223517	1172774	0	0	0	0	0	0
2022	CP22100	21.30	O	222769	1174576	17	0	0	0	0	5
2022	CP22242	34.40	O	223533	1172723	0	0	0	0	0	0
2022	CP22504	34.00	O	223358	1173154	0	0	0	0	0	0
2022	CP22016	22.92	V	223376	1173050	11	2	1	1	0	8
2022	NTRI-013		V	222929	1174174	1	0	0	0	2	2

Annex 3 : Character list for all 106 skeletal structures (upper jaw, neurocranium, palate, lower jaw, hyoid apparatus, plastron, pectoral girdle, upper limb, manus, pelvic girdle, lower limb, pes, carapace).

- | | |
|---|--|
| <p>1. Premaxilla</p> <p>0. absent
2. ossified</p> <p>2. Maxilla</p> <p>0. absent
2. ossified</p> <p>3. Jugal</p> <p>0. absent
2. ossified</p> <p>4. Quadratojugal</p> <p>0. absent
2. ossified</p> <p>5. Quadrate</p> <p>1. cartilaginous
2. ossified</p> <p>6. Prefrontal</p> <p>0. absent
1. cartilaginous
2. ossified</p> <p>7. Frontal</p> | <p>0. absent
1. cartilaginous
2. ossified</p> <p>8. Postorbital</p> <p>0. absent
1. cartilaginous
2. ossified</p> <p>9. Parietal</p> <p>0. absent
2. ossified</p> <p>10. Squamosal</p> <p>0. absent
2. ossified</p> <p>11. Opisthotic</p> <p>1. cartilaginous
2. ossified</p> <p>12. Prootic</p> <p>1. cartilaginous
2. ossified</p> <p>13. Supraoccipital</p> <p>1. cartilaginous
2. ossified</p> |
|---|--|

0. absent
2. ossified
- 14. Basioccipital**
1. cartilaginous
2. ossified
- 15. Exoccipital**
1. cartilaginous
2. ossified
- 16. Basisphenoid**
1. cartilaginous
2. ossified
- 17. Stapes**
1. cartilaginous
2. ossified
- 18. Vomer**
0. absent
2. ossified
- 19. Pterygoid**
1. cartilaginous
2. ossified
- 20. Palatine**
0. absent
2. ossified
- 21. Dentary**
0. absent
2. ossified
- 22. Coronoid**
0. absent
2. ossified
- 23. Angular**
0. absent
2. ossified
- 24. Surangular**
0. absent
2. ossified
- 25. Prearticular**
- 26. Articular**
0. absent
2. ossified
- 27. Ceratohyal bone**
0. absent
1. cartilaginous
2. ossified
- 28. Ceratobranchial bone**
0. absent
1. cartilaginous
2. ossified
- 29. Epiplastron**
0. absent
2. ossified
- 30. Entoplastron**
0. absent
1. cartilaginous
2. ossified
- 31. Hyoplastron**
0. absent
2. ossified
- 32. Hypoplastron**
0. absent
2. ossified
- 33. Xiphiplastron**
0. absent
2. ossified
- 34. Acromion**
0. absent
1. cartilaginous
2. ossified
- 35. Scapular**
0. absent
1. cartilaginous
2. ossified

- 36. Coracoid**
 0. absent
 1. cartilaginous
 2. ossified
- 37. Humerus**
 0. absent
 1. cartilaginous
 2. ossified
- 38. Radius**
 0. absent
 1. cartilaginous
 2. ossified
- 39. Ulna**
 0. absent
 1. cartilaginous
 2. ossified
- 40. Ulnare**
 0. absent
 1. cartilaginous
 2. ossified
- 41. Pisiform**
 0. absent
 1. cartilaginous
 2. ossified
- 42. Intermedium**
 0. absent
 1. cartilaginous
 2. ossified
- 43. Centrale 2**
 0. absent
 1. cartilaginous
- 44. Centrale 4**
 0. absent
 1. cartilaginous
- 45. Distal carpal 1**
 0. absent
 1. cartilaginous
- 46. Distal carpal 2**
 0. absent
 1. cartilaginous
- 47. Distal carpal 3**
 0. absent
 1. cartilaginous
 2. ossified
- 48. Distal carpal 4**
 0. absent
 1. cartilaginous
 2. ossified
- 49. Distal carpal 5**
 0. absent
 1. cartilaginous
 2. ossified
- 50. Metacarpal 1**
 0. absent
 1. cartilaginous
 2. ossified
- 51. Metacarpal 2**
 0. absent
 1. cartilaginous
 2. ossified
- 52. Metacarpal 3**
 0. absent
 1. cartilaginous
 2. ossified
- 53. Metacarpal 4**
 0. absent
 1. cartilaginous
 2. ossified
- 54. Metacarpal 5**
 0. absent
 1. cartilaginous
 2. ossified
- 55. Phalange 1 – 1**
 0. absent

1. cartilaginous
2. ossified
- 56. Phalange 1 – 2**
0. absent
1. cartilaginous
2. ossified
- 57. Phalange 2 – 1**
0. absent
1. cartilaginous
2. ossified
- 58. Phalange 2 – 2**
0. absent
1. cartilaginous
2. ossified
- 59. Phalange 2 – 3**
0. absent
1. cartilaginous
2. ossified
- 60. Phalange 3 – 1**
0. absent
1. cartilaginous
2. ossified
- 61. Phalange 3 – 2**
0. absent
1. cartilaginous
2. ossified
- 62. Phalange 3 – 3**
0. absent
1. cartilaginous
2. ossified
- 63. Phalange 4 – 1**
0. absent
1. cartilaginous
2. ossified
- 64. Phalange 4 – 2**
0. absent
1. cartilaginous
2. ossified
- 65. Phalange 4 – 3**
0. absent
1. cartilaginous
2. ossified
- 66. Phalange 5 – 1**
0. absent
1. cartilaginous
2. ossified
- 67. Phalange 5 – 2**
0. absent
1. cartilaginous
2. ossified
- 68. Pubis**
0. absent
1. cartilaginous
2. ossified
- 69. Ilium**
0. absent
1. cartilaginous
2. ossified
- 70. Ischium**
0. absent
1. cartilaginous
2. ossified
- 71. Femur**
0. absent
1. cartilaginous
2. ossified
- 72. Tibia**
0. absent
1. cartilaginous
2. ossified
- 73. Fibula**
0. absent
1. cartilaginous
2. ossified
- 74. Fibulare**
0. absent
1. cartilaginous

- 2. ossified
- 75. Intermedium**
 - 0. absent
 - 1. cartilaginous
 - 2. ossified
- 76. Distal tarsal 1**
 - 0. absent
 - 1. cartilaginous
- 77. Distal tarsal 2**
 - 0. absent
 - 1. cartilaginous
- 78. Distal tarsal 3**
 - 0. absent
 - 1. cartilaginous
 - 2. ossified
- 79. Distal tarsal 4**
 - 0. absent
 - 1. cartilaginous
 - 2. ossified
- 80. Distal tarsal 5**
 - 0. absent
 - 1. cartilaginous
 - 2. ossified
- 81. Metatarsal 1**
 - 0. absent
 - 1. cartilaginous
 - 2. ossified
- 82. Metatarsal 2**
 - 0. absent
 - 1. cartilaginous
 - 2. ossified
- 83. Metatarsal 3**
 - 0. absent
 - 1. cartilaginous
 - 2. ossified
- 84. Metatarsal 4**
 - 0. absent
- 1. cartilaginous
- 2. ossified
- 85. Metatarsal 5**
 - 0. absent
 - 1. cartilaginous
 - 2. ossified
- 86. Phalange 1 – 1**
 - 0. absent
 - 1. cartilaginous
 - 2. ossified
- 87. Phalange 1 – 2**
 - 0. absent
 - 1. cartilaginous
 - 2. ossified
- 88. Phalange 2 – 1**
 - 0. absent
 - 1. cartilaginous
 - 2. ossified
- 89. Phalange 2 – 2**
 - 0. absent
 - 1. cartilaginous
 - 2. ossified
- 90. Phalange 2 – 3**
 - 0. absent
 - 1. cartilaginous
 - 2. ossified
- 91. Phalange 3 – 1**
 - 0. absent
 - 1. cartilaginous
 - 2. ossified
- 92. Phalange 3 – 2**
 - 0. absent
 - 1. cartilaginous
 - 2. ossified
- 93. Phalange 3 – 3**
 - 0. absent
 - 1. cartilaginous
 - 2. ossified

- 94. Phalange 4 – 1**
0. absent
1. cartilaginous
2. ossified

- 95. Phalange 4 – 2**
0. absent
1. cartilaginous
2. ossified

- 96. Phalange 4 – 3**
0. absent
1. cartilaginous
2. ossified

- 97. Phalange 5 – 1**
0. absent
1. cartilaginous
2. ossified

- 98. Phalange 5 – 2**
0. absent
1. cartilaginous
2. ossified

- 99. Nuchal bone**
0. absent
1. cartilaginous

2. ossified

- 100. Cervical vertebrae**
1. cartilaginous
2. ossified

- 101. Thoracic vertebrae**
1. cartilaginous
2. ossified

- 102. Lumbar vertebrae**
1. cartilaginous
2. ossified

- 103. Sacral vertebrae**
1. cartilaginous
2. ossified

- 104. Caudal vertebrae**
1. cartilaginous
2. ossified

- 105. Ribs**
1. cartilaginous
2. ossified

- 106. Peripheral bones**
0. absent
1. cartilaginous

Annex 4 : Character and specimens matrix of skeletal structures in the upper jaw.

Specimens	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
116916	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
116917	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
116918	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
116919	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
116920	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
290506	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
290507	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
290508	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
290509	0	0	0	0	1	0	0	0	2	2
290510	0	0	0	0	1	0	0	0	2	2
290511	0	0	0	0	1	2	2	2	0	2
290512	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
290513	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
290514	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
290515	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
290516	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
290517										
290518										
290519	2	2	2	2	2	1	1	1	2	2
290520	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
290521	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
116907_1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
116907_2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
116907_3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
116907_4	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
116907_5	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
116907_6	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
116907_7	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
116907_8	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
116907_9	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
116908	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
116909	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
116910	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
116911	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
116913	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
116914	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
116921	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
116922	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
116923	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
116924	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
116925	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
116926	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
129719_1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
129719_2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
347167	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2

Annex 5 : Character and specimens matrix of skeletal structures in the neurocranium.

Specimens	11	12	13	14	15	16	17
116916	2	2	2	2	2	2	2
116917	2	2	2	2	2	2	2
116918	2	2	2	2	2	2	2

116919	2	2	2	2	2	2	2
116920	2	2	2	2	2	2	2
290506	1	1	1	1	1	1	1
290507	1	1	1	1	1	1	1
290508	1	1	1	1	1	1	1
290509	1	1	1	1	1	1	1
290510	1	1	1	1	1	1	1
290511	1	1	1	2	2	2	2
290512	1	1	1	2	2	2	2
290513	1	1	1	2	2	2	2
290514	1	1	2	2	2	2	2
290515	1	1	2	2	2	2	2
290516	1	1	1	1	1	1	1
290517							
290518							
290519	1	1	1	1	1	1	1
290520	1	1	1	2	2	2	2
290521	2	2	2	2	2	2	2
116907_1	1	1	1	1	1	1	1
116907_2	1	1	1	2	2	2	2
116907_3	1	1	1	1	1	2	2
116907_4	1	1	1	2	2	2	2
116907_5	1	1	1	1	1	1	1
116907_6	1	1	1	2	2	2	2
116907_7	1	1	1	2	2	2	2
116907_8	1	1	1	1	1	2	2
116907_9	1	1	1	2	2	2	2
116908	2	2	2	2	2	2	2
116909	2	2	2	2	2	2	2
116910	2	2	2	2	2	2	2
116911	2	2	2	2	2	2	2
116913	2	2	2	2	2	2	2
116914	2	2	2	2	2	2	2
116921	2	2	2	2	2	2	2
116922	2	2	2	2	2	2	2
116923	2	2	2	2	2	2	2
116924	2	2	2	2	2	2	2
116925	2	2	2	2	2	2	2
116926	2	2	2	2	2	2	2
129719_1	1	1	1	2	2	2	2
129719_2	1	1	1	2	2	2	2
347167	1	1	1	2	2	2	2

Annex 6 : Character and specimens matrix of skeletal structures in the palate.

Specimens	18	19	20
116916	2	2	2
116917	2	2	2
116918	2	2	2
116919	2	2	2
116920	2	2	2
290506	0	1	0
290507	0	1	0
290508	0	1	0
290509	0	2	2
290510	0	2	2
290511	2	2	2
290512	2	2	2
290513	2	2	2
290514	2	2	2

290515	2	2	2
290516	0	1	0
290517			
290518			
290519	0	2	2
290520	2	2	2
290521	2	2	2
116907_1	2	2	2
116907_2	2	2	2
116907_3	2	2	2
116907_4	2	2	2
116907_5	2	2	2
116907_6	2	2	2
116907_7	2	2	2
116907_8	2	2	2
116907_9	2	2	2
116908	2	2	2
116909	2	2	2
116910	2	2	2
116911	2	2	2
116913	2	2	2
116914	2	2	2
116921	2	2	2
116922	2	2	2
116923	2	2	2
116924	2	2	2
116925	2	2	2
116926	2	2	2
129719_1	2	2	2
129719_2	2	2	2
347167	2	2	2

Annex 7 : Character and specimens matrix of skeletal structures in the lower jaw.

Specimens	21	22	23	24	25	26
116916	2	2	2	2	2	2
116917	2	2	2	2	2	2
116918	2	2	2	2	2	2
116919	2	2	2	2	2	2
116920	2	2	2	2	2	2
290506	0	0	0	0	0	0
290507	0	0	0	0	0	0
290508	0	0	0	0	0	0
290509	2	0	0	0	0	0
290510	2	0	2	2	2	2
290511	2	2	2	2	2	2
290512	2	2	2	2	2	2
290513	2	2	2	2	2	2
290514	2	2	2	2	2	2
290515	2	2	2	2	0	0
290516	0	0	0	0	0	0
290517	0	0	0	0	0	0
290518						
290519	2	2	2	2	2	2
290520	2	2	2	2	2	2
290521	2	2	2	2	2	2
116907_1	2	2	2	2	2	2
116907_2	2	2	2	2	2	2
116907_3	2	2	2	2	2	2

116907_4	2	2	2	2	2	2
116907_5	2	2	2	2	2	2
116907_6	2	2	2	2	2	2
116907_7	2	2	2	2	2	2
116907_8	2	2	2	2	2	2
116907_9	2	2	2	2	2	2
116908	2	2	2	2	2	2
116909	2	2	2	2	2	2
116910	2	2	2	2	2	2
116911	2	2	2	2	2	2
116913	2	2	2	2	2	2
116914	2	2	2	2	2	2
116921	2	2	2	2	2	2
116922	2	2	2	2	2	2
116923	2	2	2	2	2	2
116924	2	2	2	2	2	2
116925	2	2	2	2	2	2
116926	2	2	2	2	2	2
129719_1	2	2	2	2	2	2
129719_2	2	2	2	2	2	2
347167	2	2	2	2	2	2

Annex 8 : Character and specimens matrix of skeletal structures in the hyoid apparatus.

Specimens	27	28
116916	1	2
116917	1	2
116918	1	2
116919	1	2
116920	1	2
290506	0	0
290507	0	0
290508	0	0
290509	1	1
290510	1	1
290511	1	1
290512	1	1
290513	1	2
290514	1	2
290515	1	1
290516	1	1
290517	1	1
290518		
290519	1	2
290520	1	2
290521	1	2
116907_1	1	2
116907_2	1	2
116907_3	1	2
116907_4	1	2
116907_5	1	2
116907_6	1	2
116907_7	1	2
116907_8	1	2
116907_9	1	2
116908	1	2
116909	1	2
116910	1	2

116911	1	2
116913	1	2
116914	1	2
116921	1	2
116922	1	2
116923	1	2
116924	1	2
116925	1	2
116926	1	2
129719_1	1	2
129719_2	1	2
347167	1	2

Annex 9 : Character and specimens matrix of skeletal structures in the plastron.

Specimens	29	30	31	32	33
116916	2	2	2	2	2
116917	2	2	2	2	2
116918	2	2	2	2	2
116919	2	2	2	2	2
116920	2	2	2	2	2
290506	0	0	0	0	0
290507	0	0	0	0	0
290508	0	0	0	0	0
290509	2	1	2	2	2
290510	2	1	2	2	2
290511	2	2	2	2	2
290512	2	2	2	2	2
290513	2	2	2	2	2
290514	2	2	2	2	2
290515	2	2	2	2	2
290516	0	0	0	0	0
290517	0	0	0	0	0
290518	0	0	0	0	0
290519	2	2	2	2	2
290520	2	2	2	2	2
290521	2	2	2	2	2
116907_1	2	2	2	2	2
116907_2	2	2	2	2	2
116907_3	2	2	2	2	2
116907_4	2	2	2	2	2
116907_5	2	2	2	2	2
116907_6	2	2	2	2	2
116907_7	2	2	2	2	2
116907_8	2	2	2	2	2
116907_9	2	2	2	2	2
116908	2	2	2	2	2
116909	2	2	2	2	2
116910	2	2	2	2	2
116911	2	2	2	2	2
116913	2	2	2	2	2
116914	2	2	2	2	2
116921	2	2	2	2	2
116922	2	2	2	2	2
116923	2	2	2	2	2
116924	2	2	2	2	2
116925	2	2	2	2	2
116926	2	2	2	2	2

129719_1	2	2	2	2	2
129719_2	2	2	2	2	2
347167	2	2	2	2	2

Annex 10 : Character and specimens matrix of skeletal structures in the pectoral girdle.

Specimens	34	35	36
116916	2	2	2
116917	2	2	2
116918	2	2	2
116919	2	2	2
116920	2	2	2
290506	0	1	1
290507	0	0	0
290508	0	0	0
290509	2	2	2
290510	2	2	2
290511	2	2	2
290512	2	2	2
290513	2	2	2
290514	2	2	2
290515	2	2	2
290516	1	1	1
290517	1	1	1
290518	1	1	1
290519	2	2	2
290520	2	2	2
290521	2	2	2
116907_1	1	2	2
116907_2	2	2	2
116907_3	2	2	2
116907_4	2	2	2
116907_5	1	2	2
116907_6	2	2	2
116907_7	2	2	2
116907_8	1	2	2
116907_9	2	2	2
116908	2	2	2
116909	2	2	2
116910	2	2	2
116911	2	2	2
116913	2	2	2
116914	2	2	2
116921	2	2	2
116922	2	2	2
116923	2	2	2
116924	2	2	2
116925	2	2	2
116926	2	2	2
129719_1	2	2	2
129719_2	2	2	2
347167	1	2	2

Annex 11 : Character and specimens matrix of skeletal structures in the upper limb.

Specimens	37	38	39
116916	2	2	2
116917	2	2	2
116918	2	2	2
116919	2	2	2
116920	2	2	2
290506	1	1	1
290507	0	0	0
290508	0	0	0
290509	2	2	2
290510	2	2	2
290511	2	2	2
290512	2	2	2
290513	2	2	2
290514	2	2	2
290515	2	2	2
290516	0	0	0
290517	1	1	1
290518	1	1	1
290519	2	2	2
290520	2	2	2
290521	2	2	2
116907_1	2	2	2
116907_2	2	2	2
116907_3	2	2	2
116907_4	2	2	2
116907_5	2	2	2
116907_6	2	2	2
116907_7	2	2	2
116907_8	2	2	2
116907_9	2	2	2
116908	2	2	2
116909	2	2	2
116910	2	2	2
116911	2	2	2
116913	2	2	2
116914	2	2	2
116921	2	2	2
116922	2	2	2
116923	2	2	2
116924	2	2	2
116925	2	2	2
116926	2	2	2
129719_1	2	2	2
129719_2	2	2	2
347167	2	2	2

Annex 12 : Character and specimens matrix of skeletal structures in the manus.

Specimens	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67
116916	2	2	2	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
116917	2	2	2	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
116918	2	2	2	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
116919	2	2	2	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
116920	2	2	2	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
290506	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
290507	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
290508	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
290509	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	

290510	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	1	2	1	
290511	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	1	1	2	2	1	1	2	2	1	2	2	1	1	1
290512	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	1	2	1	
290513	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
290514	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	1	2	2	1	2	2	
290515	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2
290516	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
290517	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
290518	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
290519	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	2	2	1	2	2	1	1	1
290520	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
290521	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
116907_1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
116907_2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	1	1	2	2	1	2	2	1	2	2	2	2	2	2
116907_3	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	1	1	2	2	1	2	2	1	2	2	2	2	2	1
116907_4	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	1	1	2	2	1	2	2	1	2	2	1	2	2	1
116907_5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
116907_6	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	1	1	2	2	1	2	2	1	2	2	1	2	2	1
116907_7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	1	1	2	2	1	2	2	1	2	2	1	2	2	1
116907_8	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	1	1	2	2	1	2	2	1	2	2	1	2	2	2
116907_9	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	1	1	2	2	1	2	2	1	2	2	1	2	2	2
116908	2	2	2	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
116909	2	2	2	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1
116910	2	2	2	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1
116911	2	2	2	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
116913	2	2	2	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
116914	2	2	2	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
116921	2	2	2	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
116922	2	2	2	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
116923	2	2	2	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1
116924	2	2	2	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1
116925	2	2	2	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1
116926	2	2	2	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
129719_1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	1	1	2	2	1	2	2	1	2	2	1	1	1	1
129719_2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	1	2	2	1	2	2	1	2	2	1	2	1	1
347167	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	1	1	2	2	1	2	2	1	2	2	1	2	1	1

Annex 13 : Character and specimens matrix of skeletal structures in the pelvic girdle.

Specimens	68	69	70
116916	2	2	2
116917	2	2	2
116918	2	2	2
116919	2	2	2
116920	2	2	2
290506	0	0	0
290507	0	0	0
290508	0	0	0
290509	1	1	1
290510	1	2	2
290511	2	2	2
290512	2	2	2
290513	2	2	2
290514	2	2	2
290515	2	2	2
290516	1	1	1
290517	1	1	1
290518	1	1	1
290519	2	2	2
290520	2	2	2
290521	2	2	2
116907_1	1	2	1

116907_2	1	2	1
116907_3	1	2	1
116907_4	1	2	1
116907_5	1	1	1
116907_6	1	2	2
116907_7	1	2	1
116907_8	1	2	1
116907_9	1	2	1
116908	2	2	2
116909	2	2	2
116910	2	2	2
116911	2	2	2
116913	2	2	2
116914	2	2	2
116921	2	2	2
116922	2	2	2
116923	2	2	2
116924	2	2	2
116925	2	2	2
116926	2	2	2
129719_1	1	2	1
129719_2	2	2	2
347167	1	1	1

Annex 14 : Character and specimens matrix of skeletal structures in the lower limb.

Specimens	71	72	73
116916	2	2	2
116917	2	2	2
116918	2	2	2
116919	2	2	2
116920	2	2	2
290506	0	0	0
290507	0	0	0
290508	0	0	0
290509	2	2	2
290510	2	2	2
290511	2	2	2
290512	2	2	2
290513	2	2	2
290514	2	2	2
290515	2	2	2
290516	0	0	0
290517	1	1	1
290518	1	1	1
290519	2	2	2
290520	2	2	2
290521	2	2	2
116907_1	2	2	2
116907_2	2	2	2
116907_3	2	2	2
116907_4	2	2	2
116907_5	2	2	2
116907_6	2	2	2
116907_7	2	2	2
116907_8	2	2	2
116907_9	2	2	2
116908	2	2	2

116909	2	2	2
116910	2	2	2
116911	2	2	2
116913	2	2	2
116914	2	2	2
116921	2	2	2
116922	2	2	2
116923	2	2	2
116924	2	2	2
116925	2	2	2
116926	2	2	2
129719_1	2	2	2
129719_2	2	2	2
347167	2	2	2

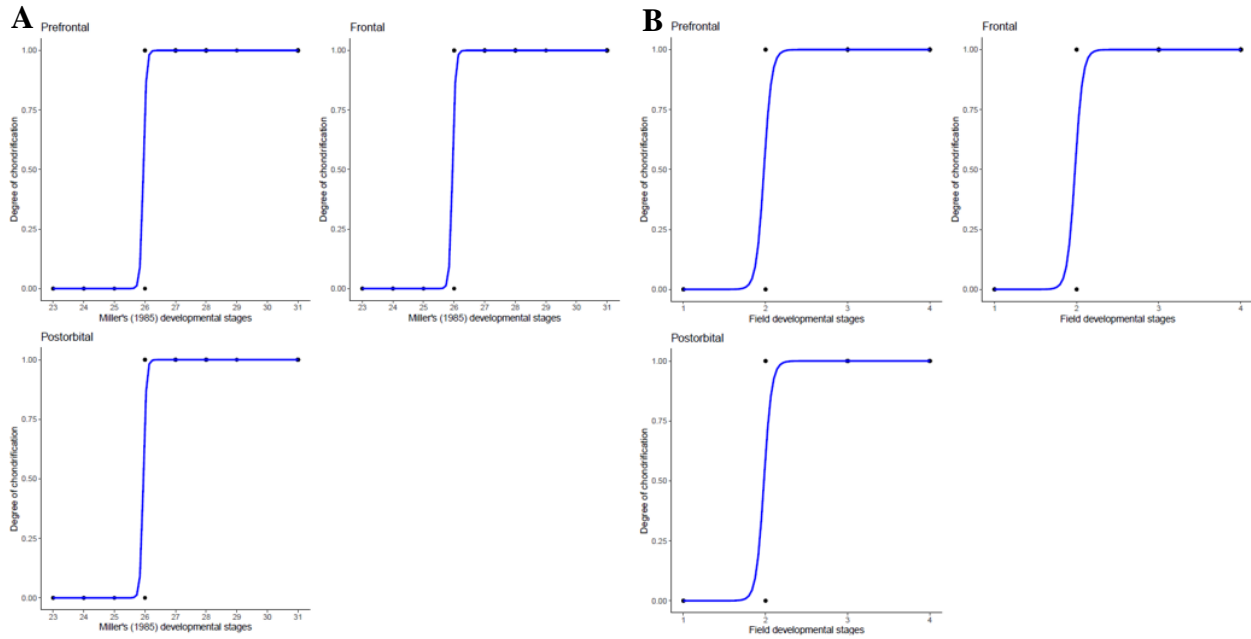
Annex 15 : Character and specimens matrix of skeletal structures in the pes.

Specimens	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98
116916	2	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
116917	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1
116918	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
116919	2	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
116920	2	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
290506	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
290507	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
290508	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
290509	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
290510	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1
290511	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
290512	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2
290513	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
290514	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
290515	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
290516	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
290517	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
290518	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
290519	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
290520	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1
290521	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	1	2	2	2	2	1	2	2	1	2	2	1	1	1
116907_1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
116907_2	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
116907_3	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
116907_4	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
116907_5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
116907_6	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
116907_7	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	1	1	2	2	1	2	2	1	2	2	1	1	1
116907_8	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
116907_9	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	1	1	2	2	1	2	2	1	2	2	1	1	1
116908	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
116909	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
116910	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1
116911	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
116913	2	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1
116914	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1
116921	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
116922	2	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1
116923	2	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1
116924	2	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1
116925	2	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1
116926	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1
129719_1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	1	1	2	2	1	2	2	1	2	2	1	1	1
129719_2	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
347167	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	1	1	2	1	1	2	1	1	2	1	1	1	1

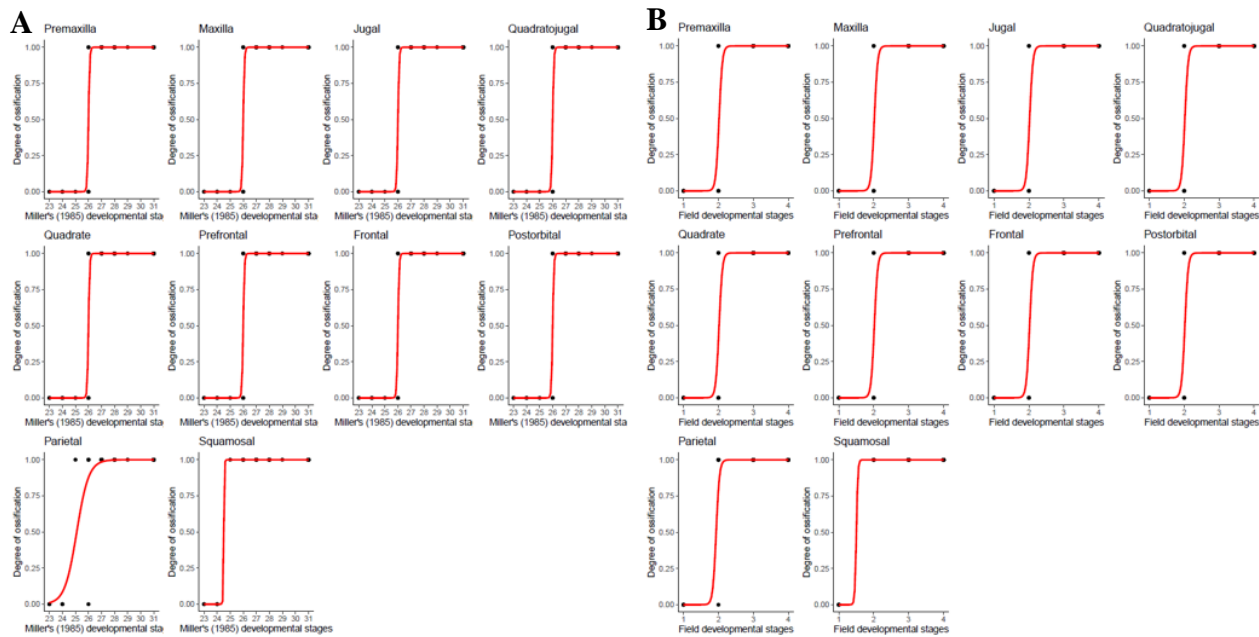
Annex 16 : Character and specimens matrix of skeletal structures in the carapace

Specimens	99	100	101	102	103	104	105	106
116916	2	2	2	2	2	2	2	1
116917	2	2	2	2	2	2	2	1
116918	2	2	2	2	2	2	2	1
116919	2	2	2	2	2	2	2	1
116920	2	2	2	2	2	2	2	1
290506	0	1	1	1	1	1	1	0
290507	0	1	1	1	1	1	1	0
290508	0	1	1	1	1	1	1	0
290509	1	2	2	1	1	1	2	1
290510	2	2	2	2	2	2	2	1
290511	2	2	2	2	2	2	2	1
290512	2	2	2	2	2	2	2	1
290513	2	2	2	2	2	2	2	1
290514	2	2	2	2	1	1	2	1
290515	2	2	2	2	2	2	2	1
290516	0	1	1	1	1	1	1	0
290517	0	1	1	1	1	1	1	1
290518	0	1	1	1	1	1	2	1
290519	1	2	2	2	1	1	2	1
290520	2	2	2	2	1	1	2	1
290521	2	2	2	2	2	1	2	1
116907_1	2	2	2	2	2	1	2	1
116907_2	2	2	2	2	2	2	2	1
116907_3	2	2	2	2	2	1	2	1
116907_4	2	2	2	2	2	1	2	1
116907_5	2	2	2	2	2	1	2	1
116907_6	2	2	2	2	2	2	2	1
116907_7	2	2	2	2	2	2	2	1
116907_8	2	2	2	2	2	1	2	1
116907_9	2	2	2	2	2	2	2	1
116908	2	2	2	2	2	2	2	1
116909	2	2	2	2	2	2	2	1
116910	2	2	2	2	2	2	2	1
116911	2	2	2	2	2	2	2	1
116913	2	2	2	2	2	2	2	1
116914	2	2	2	2	2	2	2	1
116921	2	2	2	2	2	2	2	1
116922	2	2	2	2	2	2	2	1
116923	2	2	2	2	2	2	2	1
116924	2	2	2	2	2	2	2	1
116925	2	2	2	2	2	2	2	1
116926	2	2	2	2	2	2	2	1
129719_1	2	2	2	2	2	2	2	1
129719_2	2	2	2	2	2	2	2	1
347167	2	2	2	2	2	1	2	1

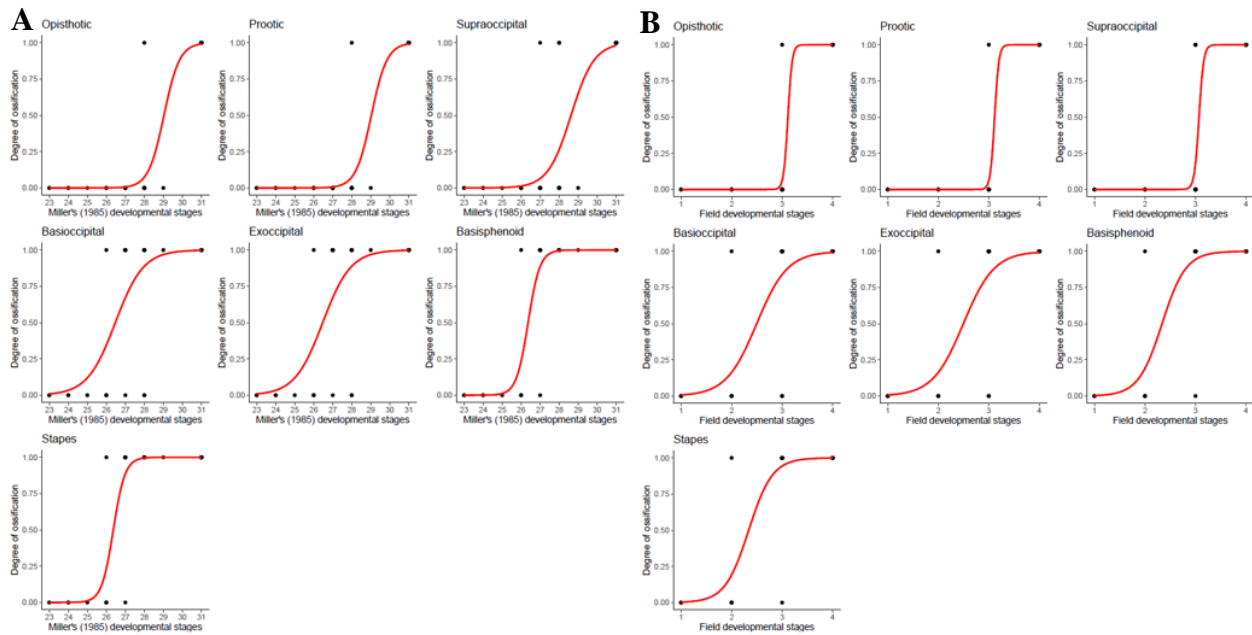
Annex 17 : Degree of chondrification of skeletal elements in the upper jaw and dermatocranium according to A: Miller's (1985) developmental stages and B: field developmental stages.



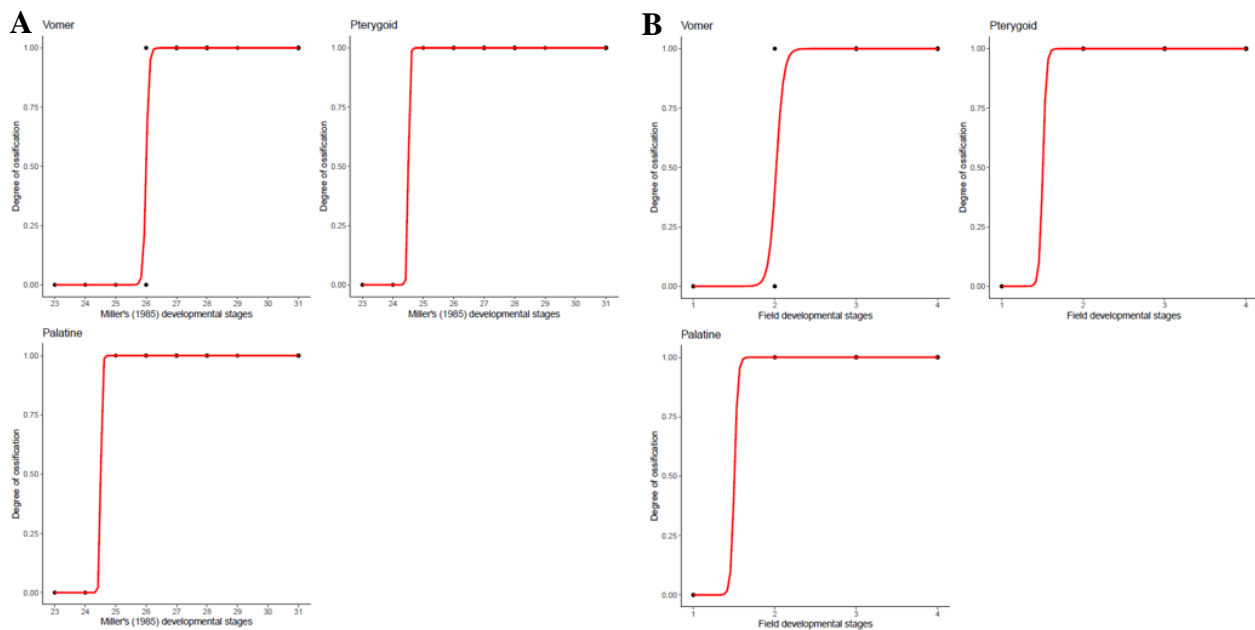
Annex 18 : Degree of ossification of skeletal elements in the upper jaw and dermatocranium according to A: Miller's (1985) developmental stages and B: field developmental stages.



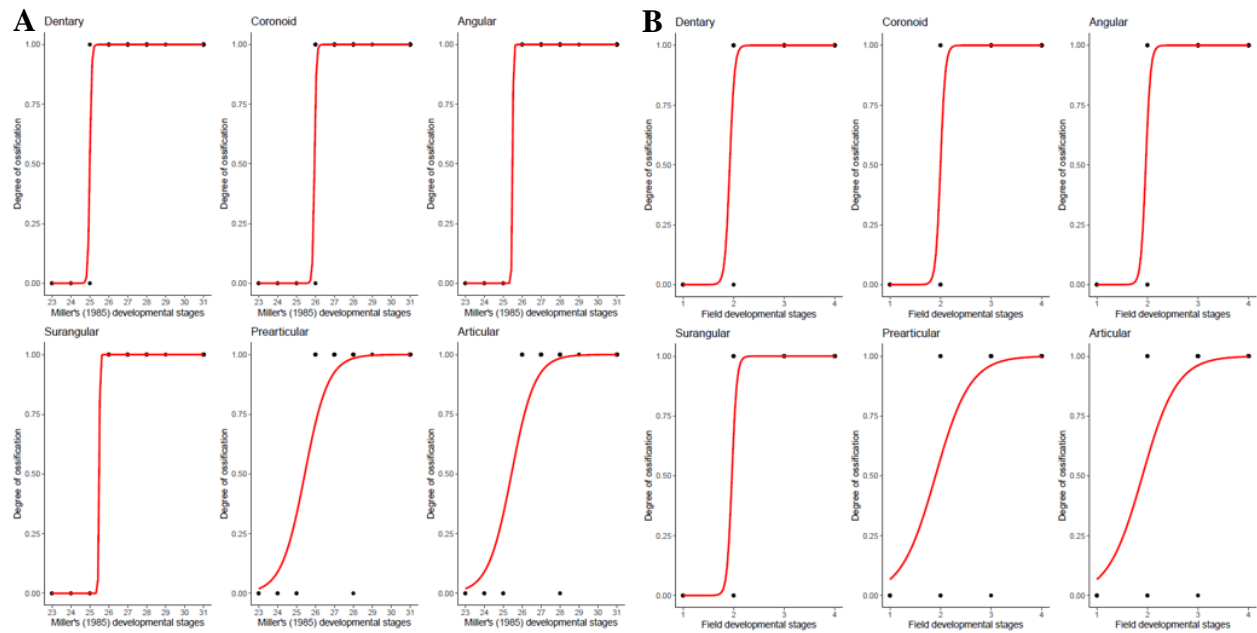
Annex 19 : Degree of ossification of skeletal elements in the neurocranium according to A: Miller's (1985) developmental stages and B: field developmental stages.



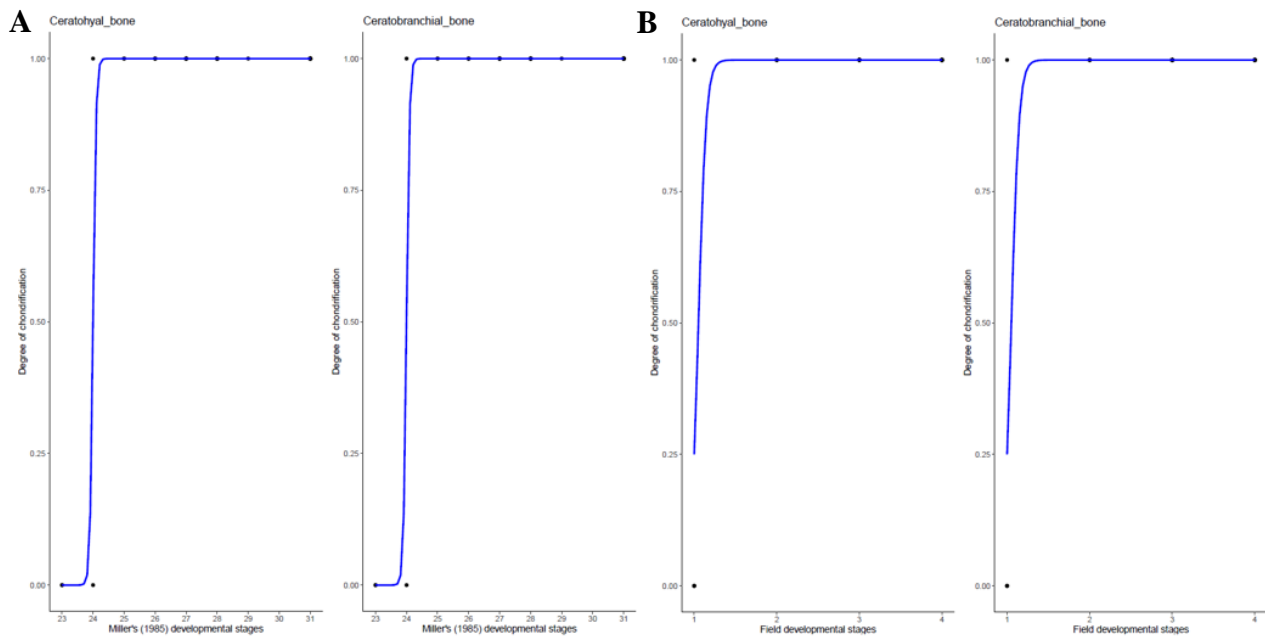
Annex 20 : Degree of ossification of skeletal elements in the palate according to A: Miller's (1985) developmental stages and B: field developmental stages.



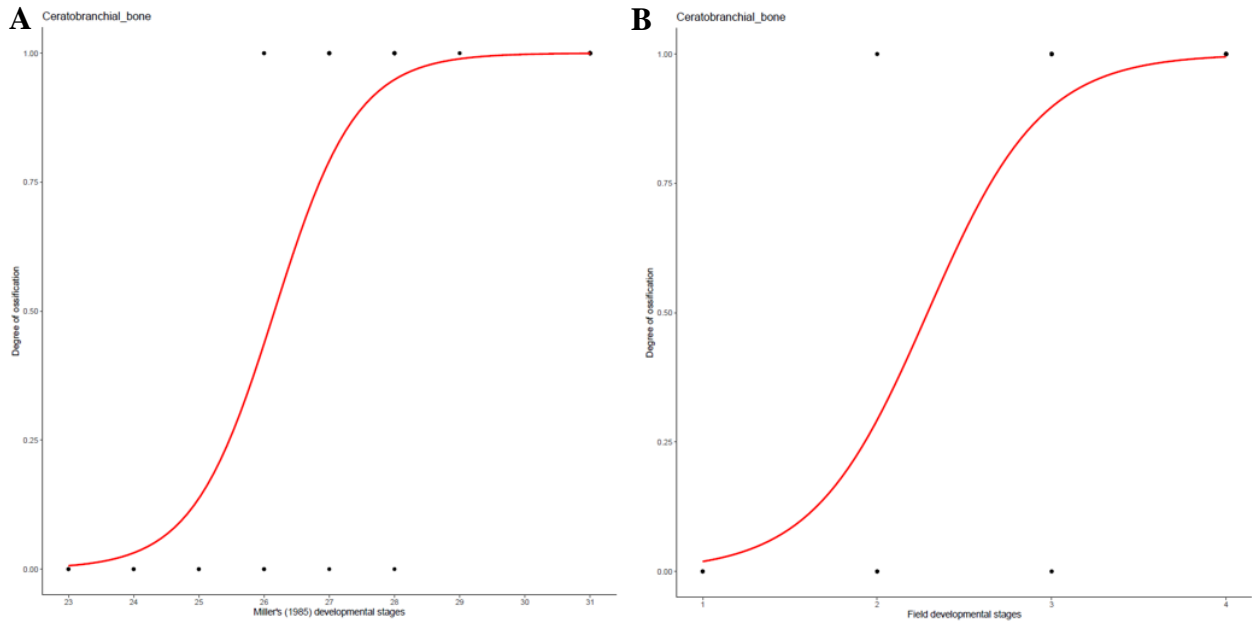
Annex 21 : Degree of ossification of skeletal elements in the lower jaw according to A: Miller's (1985) developmental stages and B: field developmental stages.



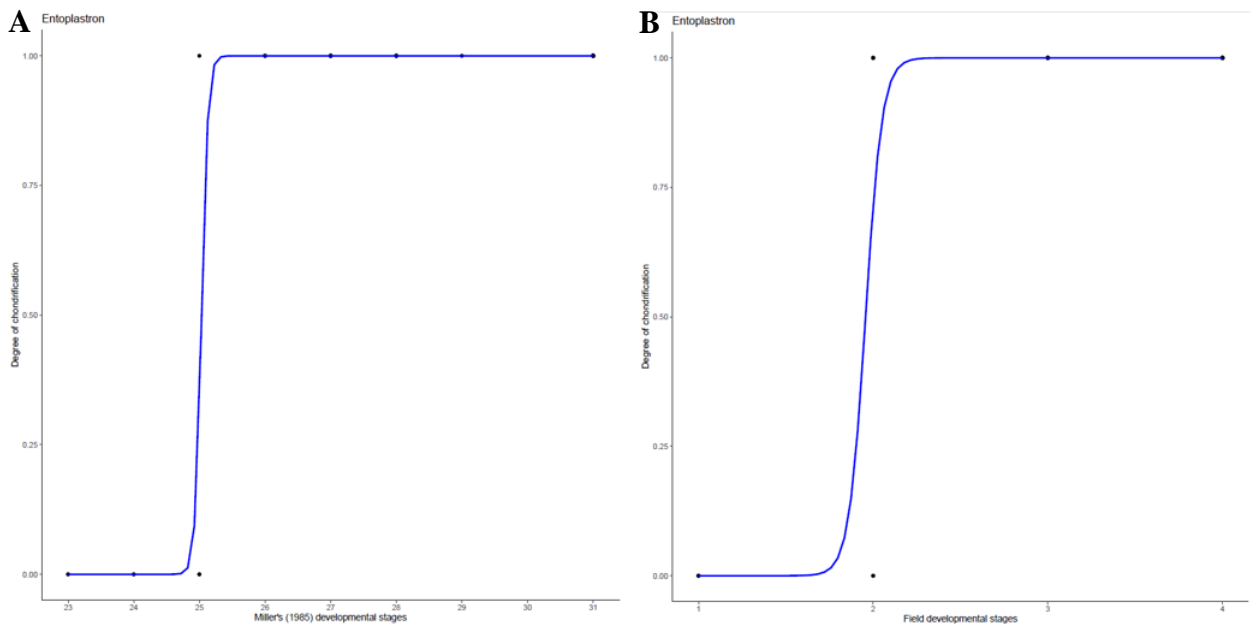
Annex 22 : Degree of chondrification of skeletal elements in the branchial-hyoid apparatus according to A: Miller's (1985) developmental stages and B: field developmental stages.



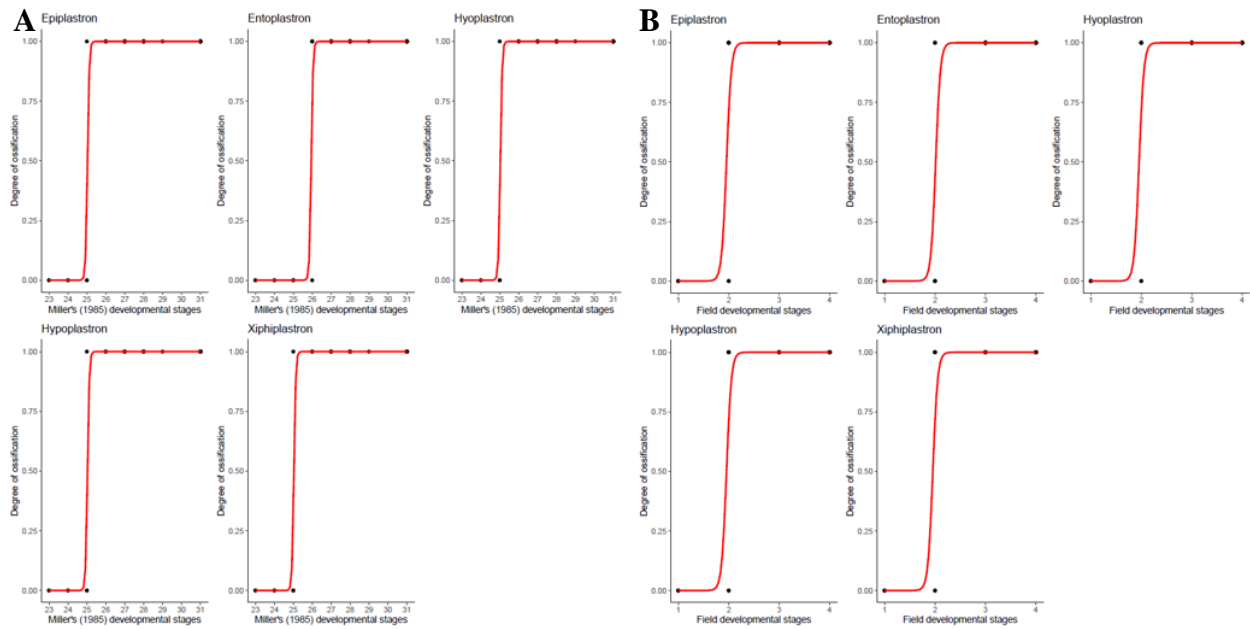
Annex 23 : Degree of ossification of skeletal elements in the branchial-hyoid apparatus according to A: Miller's (1985) developmental stages and B: field developmental stages.



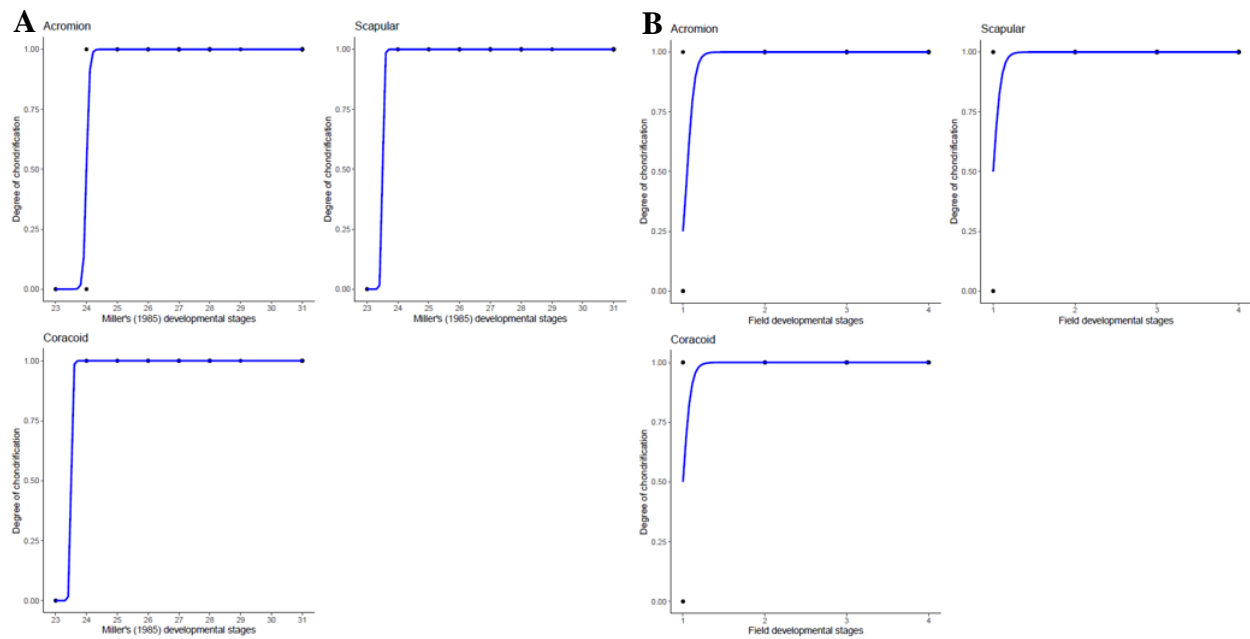
Annex 24 : Degree of chondrification of skeletal elements in the plastron according to A: Miller's (1985) developmental stages and B: field developmental stages.



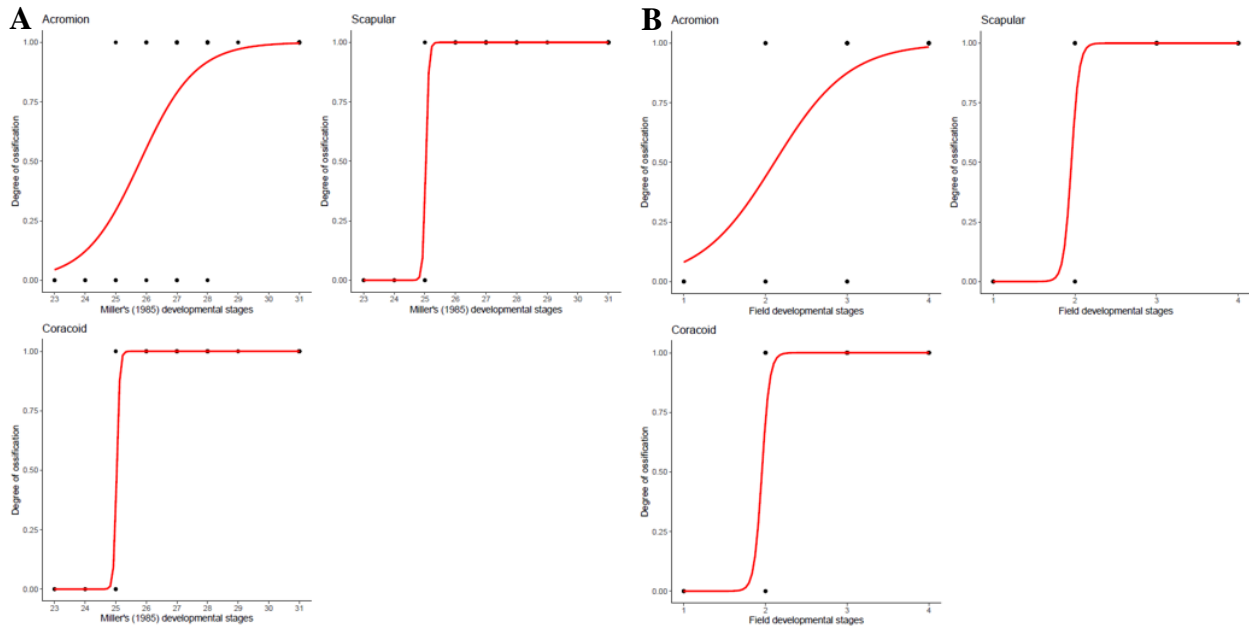
Annex 25 : Degree of ossification of skeletal elements in the plastron according to A: Miller's (1985) developmental stages and B: field developmental stages.



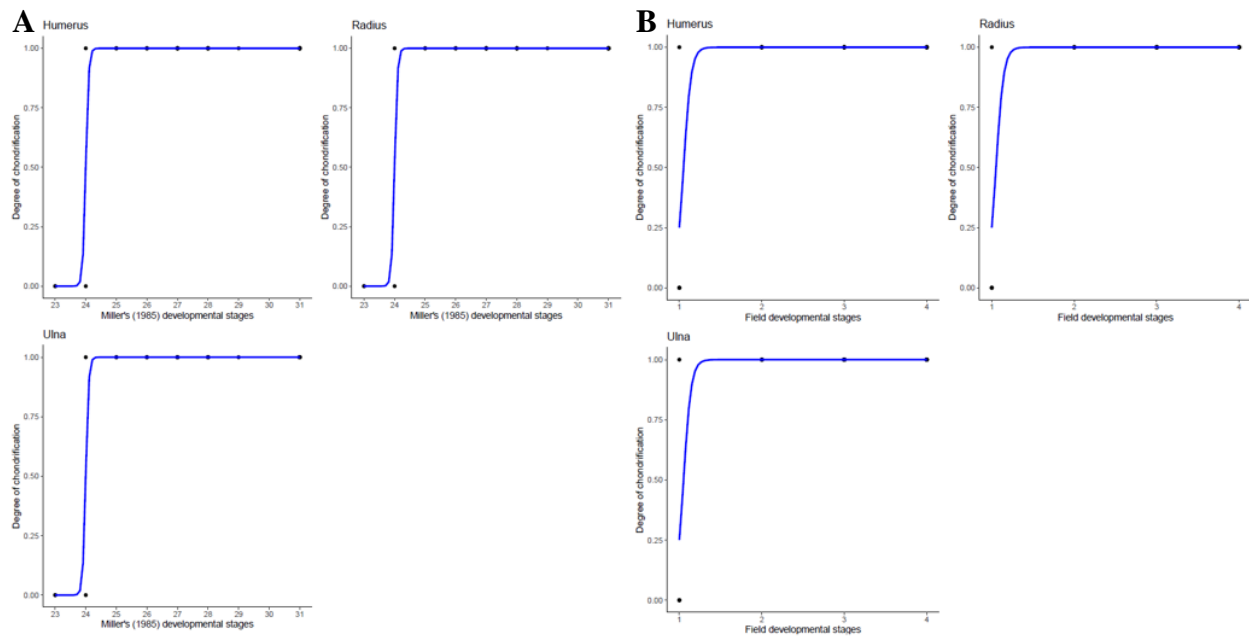
Annex 26 : Degree of chondrification of skeletal elements in the pectoral girdle according to A: Miller's (1985) developmental stages and B: field developmental stages.



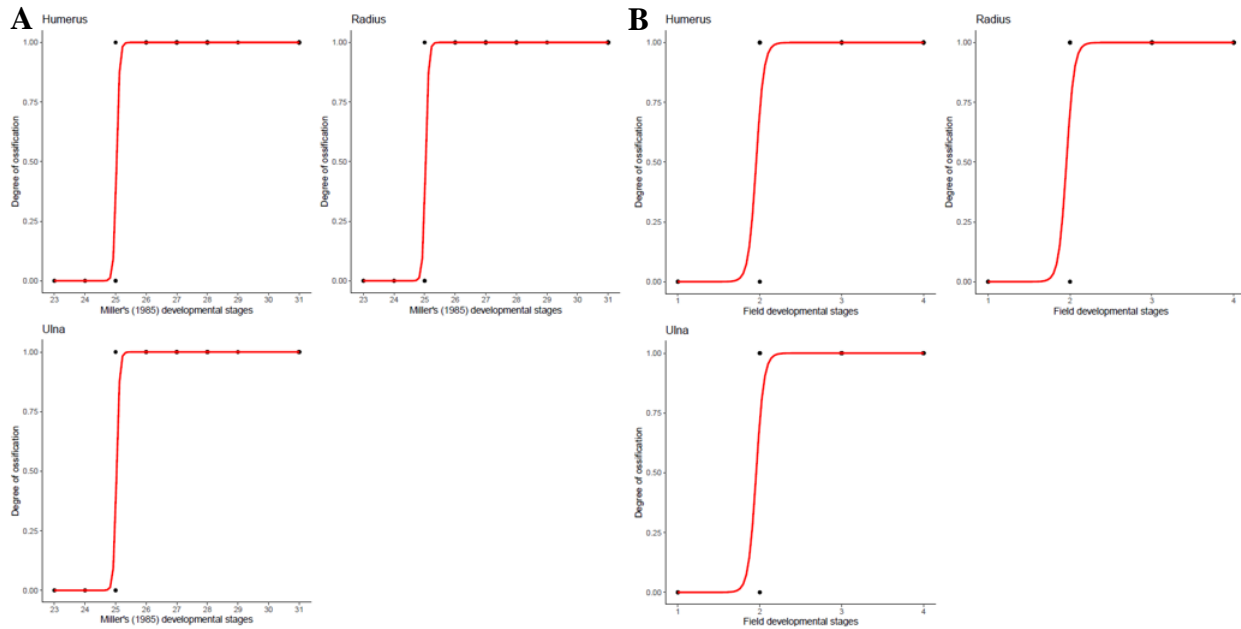
Annex 27 : Degree of ossification of skeletal elements in the pectoral girdle according to A: Miller's (1985) developmental stages and B: field developmental stages.



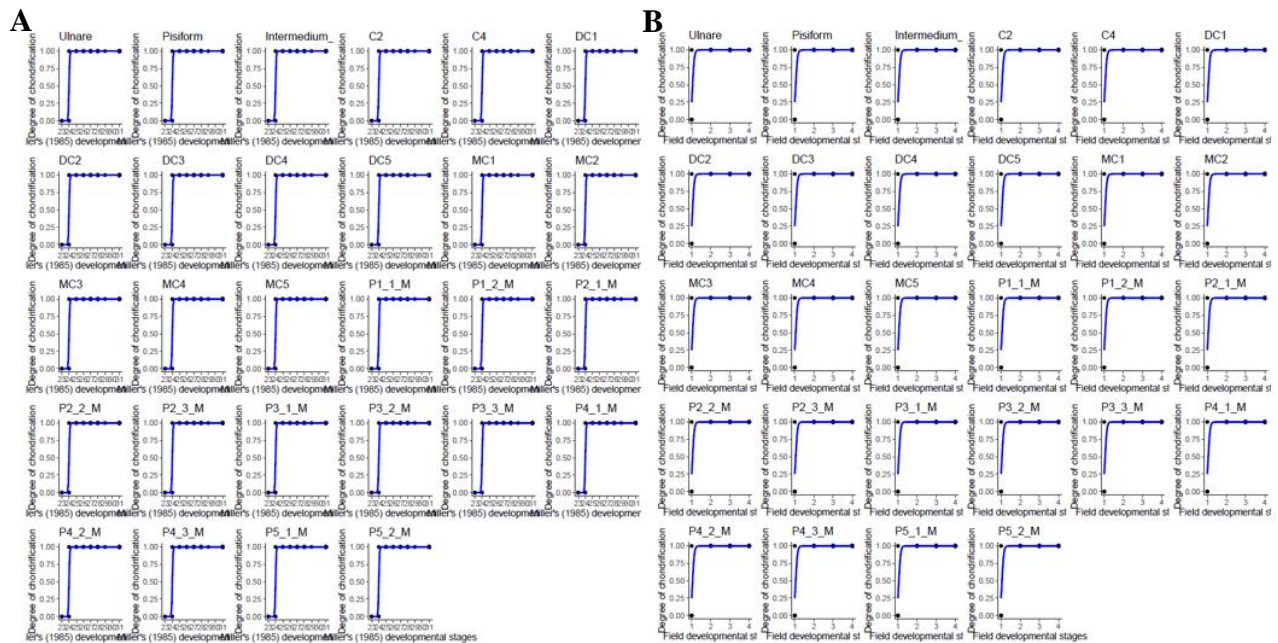
Annex 28 : Degree of chondrification of skeletal elements in the antero-proximal limb according to A: Miller's (1985) developmental stages and B: field developmental stages.



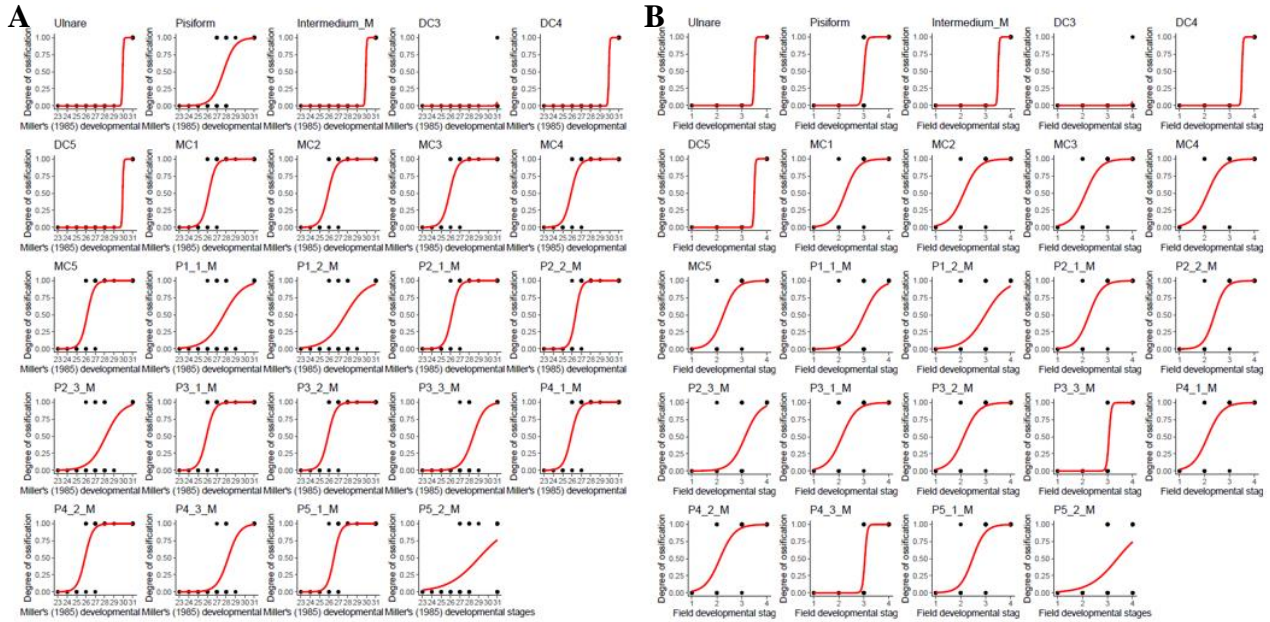
Annex 29 : Degree of ossification of skeletal elements in the antero-proximal limb according to A: Miller's (1985) developmental stages and B: field developmental stages.



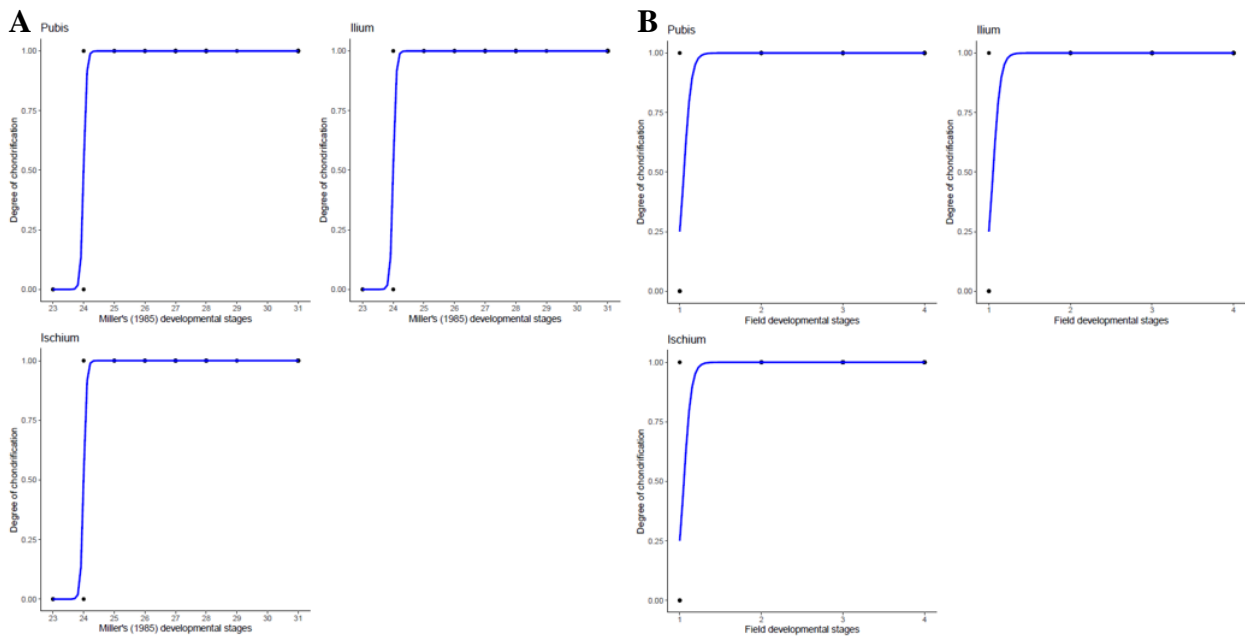
Annex 30 : Degree of chondrification of skeletal elements in the manus according to A: Miller's (1985) developmental stages and B: field developmental stages.



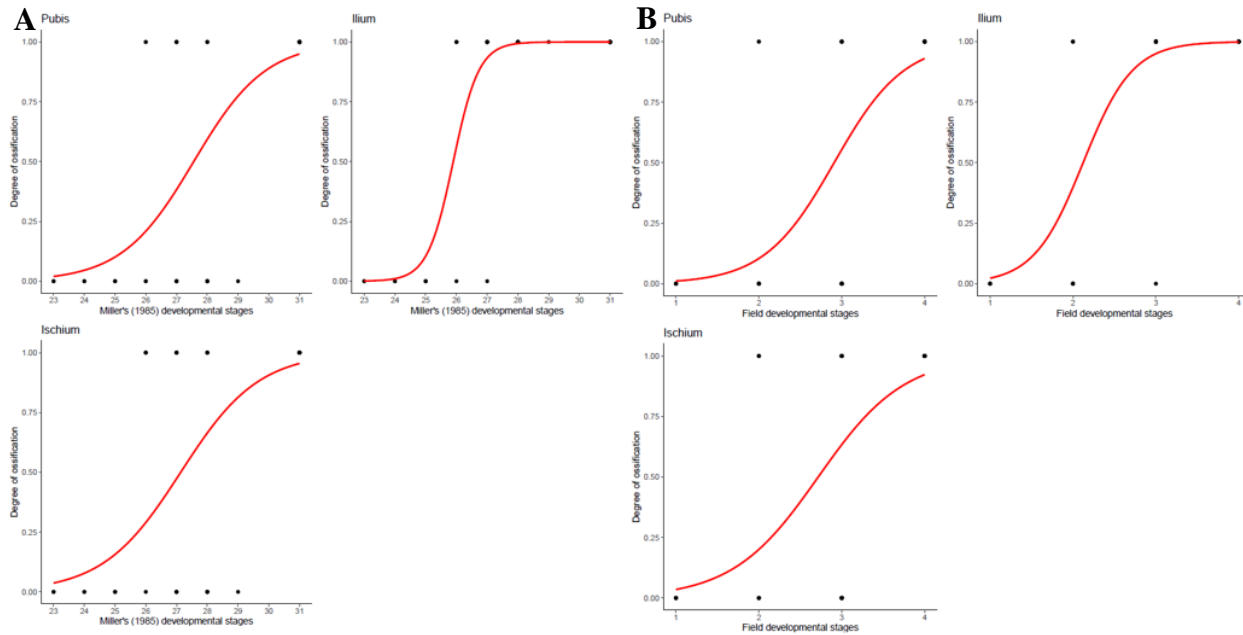
Annex 31 : Degree of ossification of skeletal elements in the manus according to A: Miller's (1985) developmental stages and B: field developmental stages.



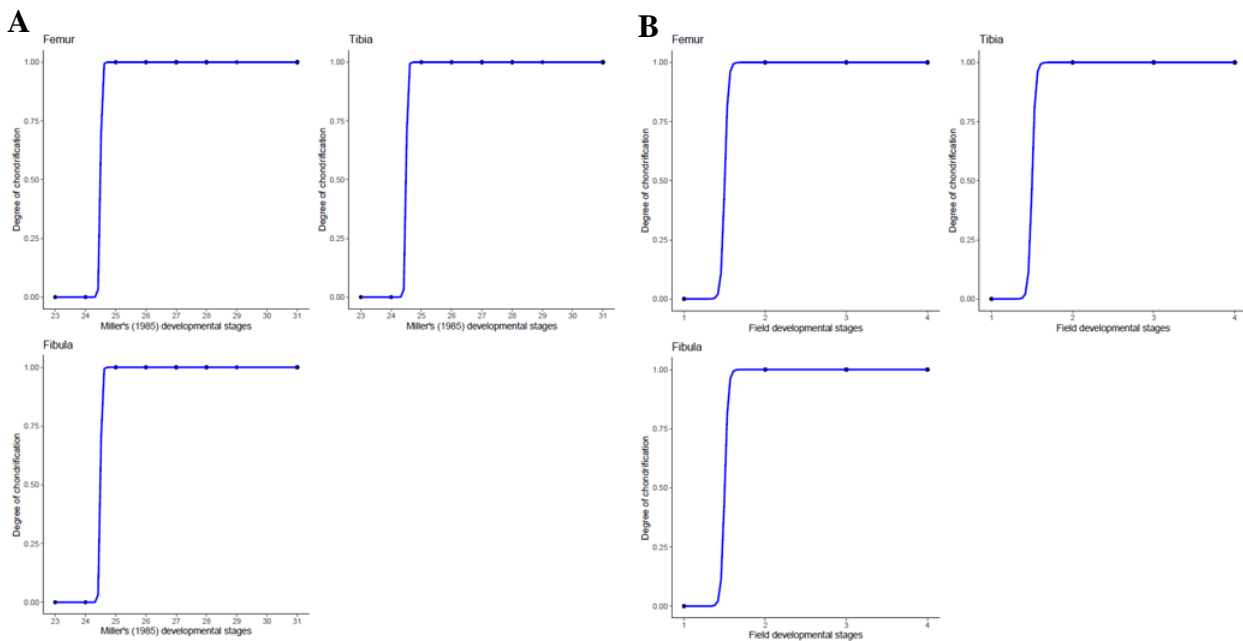
Annex 32 : Degree of chondrification of skeletal elements in the pelvic girdle according to A: Miller's (1985) developmental stages and B: field developmental stages.



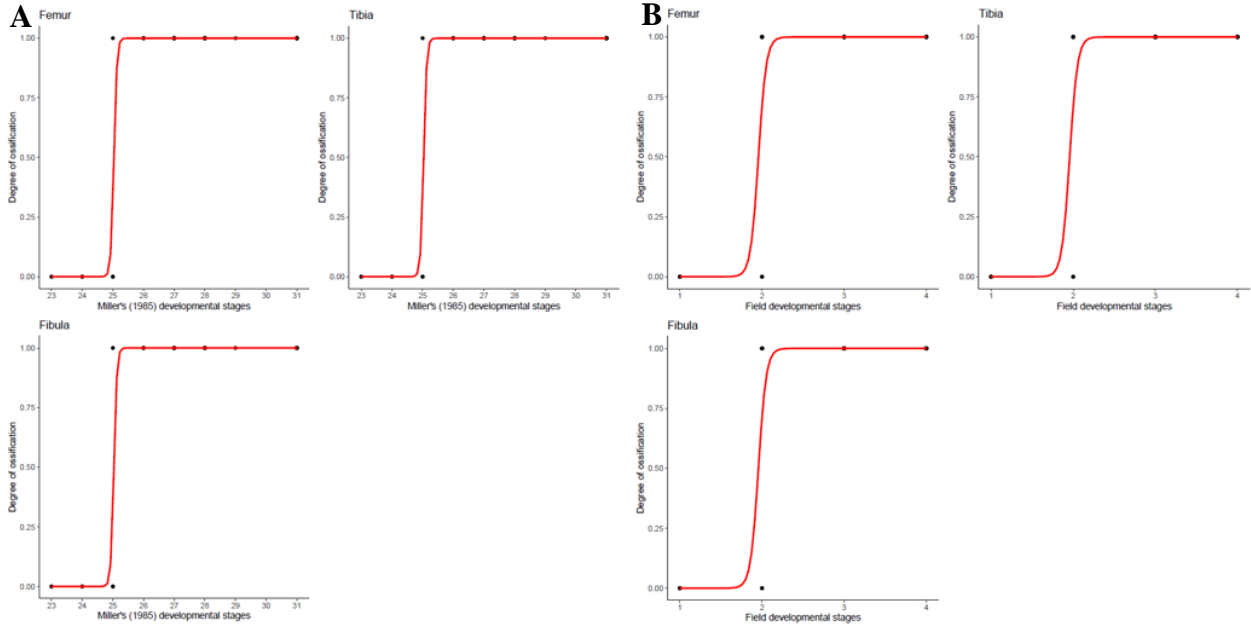
Annex 33 : Degree of ossification of skeletal elements in the pelvic girdle according to A: Miller's (1985) developmental stages and B: field developmental stages.



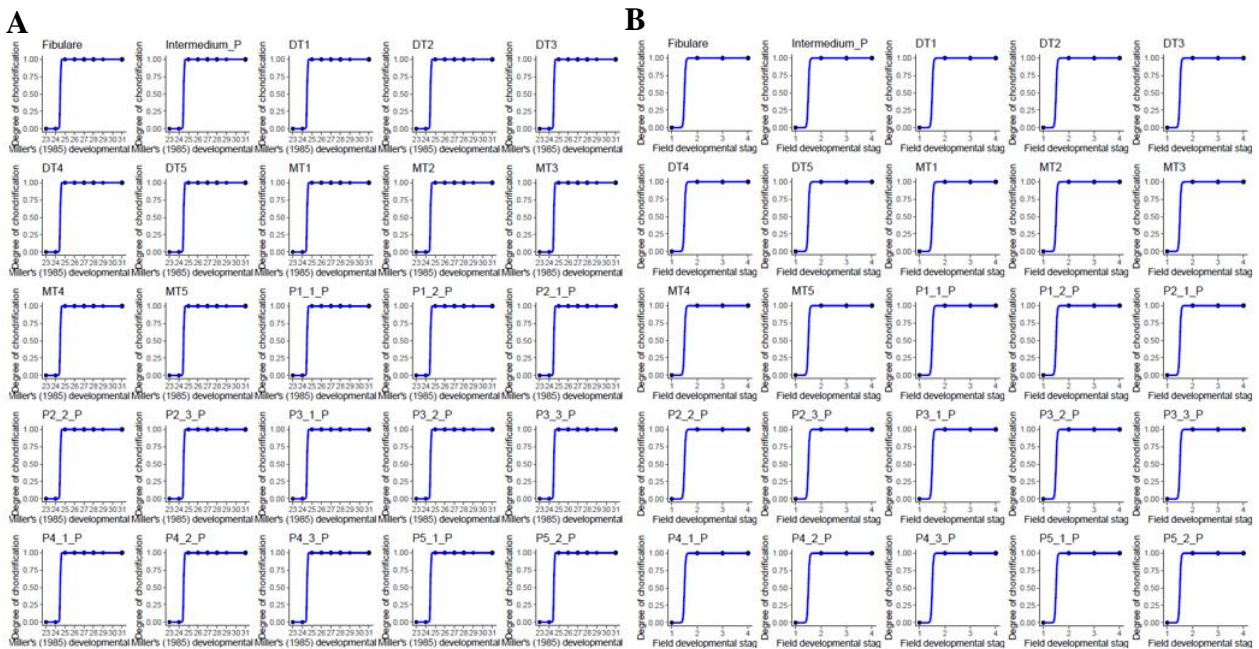
Annex 34 : Degree of chondrification of skeletal elements in the posterior limb according to A: Miller's (1985) developmental stages and B: field developmental stages.



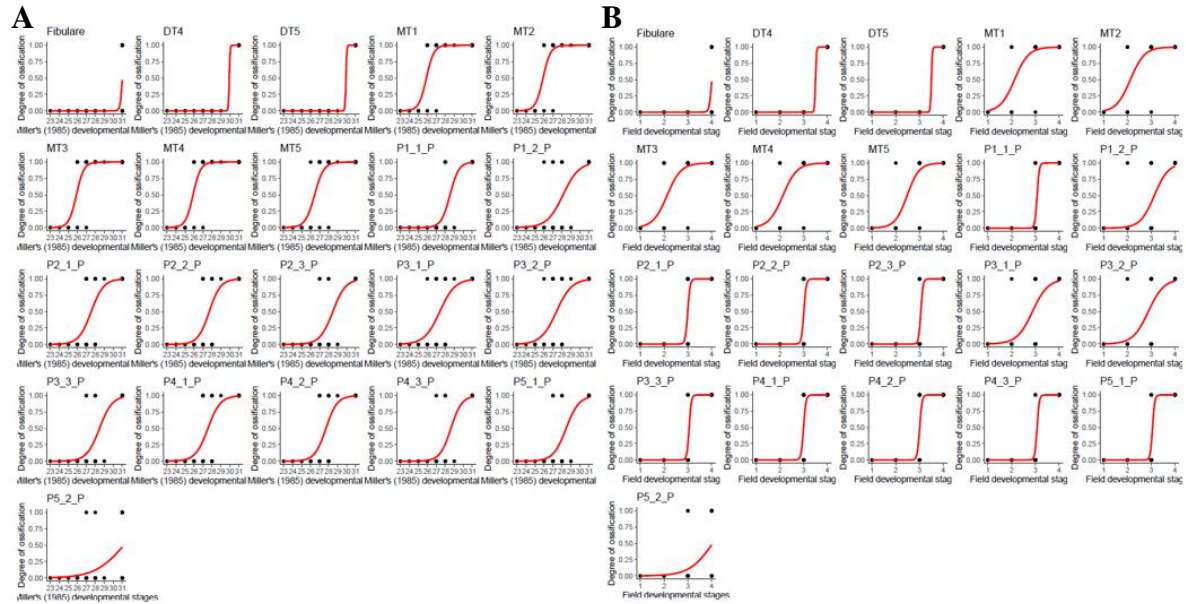
Annex 35 : Degree of ossification of skeletal elements in the posterior limb according to A: Miller's (1985) developmental stages and B: field developmental stages.



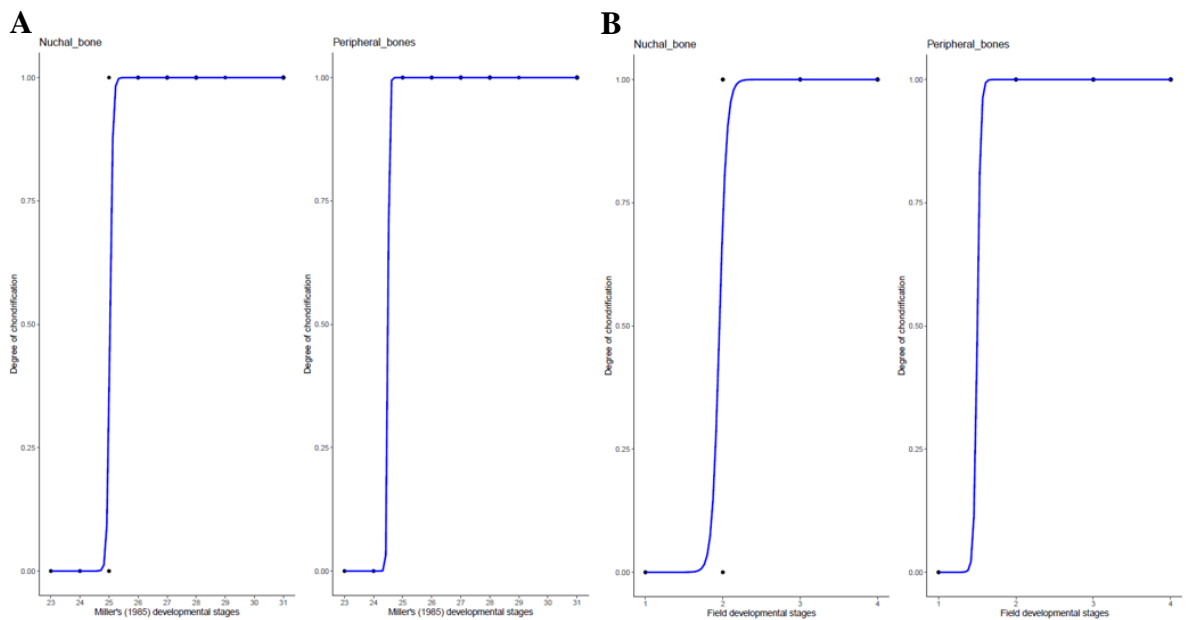
Annex 36 : Degree of chondrification of skeletal elements in the pes according to A: Miller's (1985) developmental stages and B: field developmental stages.



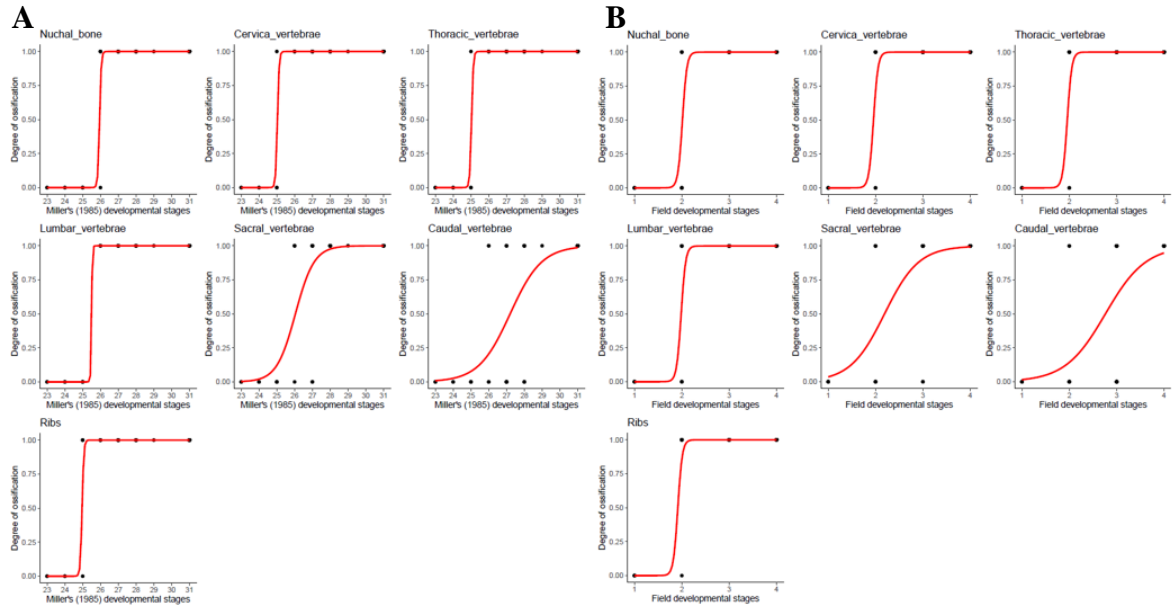
Annex 37 : Degree of ossification of skeletal elements in the pes according to A: Miller's (1985) developmental stages and B: field developmental stages.



Annex 38 : Degree of chondrification of skeletal elements in the carapace according to A: Miller's (1985) developmental stages and B: field developmental stages.



Annex 39 : Degree of ossification of skeletal elements in the carapace according to A: Miller's (1985) developmental stages and B: field developmental stages.



RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Ackerman, R. A., Seagrave, R. C., Dmi'el, R., & Ar, A. (1985). Water and heat exchange between parchment-shelled reptile eggs and their surroundings. *Copeia*, 1985, 703-711.

Alava, J. J., Keller, J. M., Kucklick, J. R., Wyneken, J., Crowder, L., & Scott, G. I. (2006). Loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) egg yolk concentrations of persistent organic pollutants and lipid increase during the last stage of embryonic development. *Science of the Total Environment*, 367(1), 170-181.

Al-Mukhaini, N., Ba-Omar, T. A., Mahmoud, I. Y., & Al-Barwani, S. (2010). Embryonic staging of the Green Turtle, *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758) (Reptilia: Cheloniidae). *Zoology in the Middle East*, 51(1), 39-50.

Bell, B. A., Spotila, J. R., Paladino, F. V., & Reina, R. D. (2004). Low reproductive success of Leatherback turtles, *Dermochelys coriacea*, is due to high embryonic mortality. *Biological Conservation*, 115(1), 131-138.

Bishop, C. A., Brooks, R. J., Carey, J. H., Ng, P., Norstrom, R. J., & Lean, D. R. (1991). The case for a cause-effect linkage between environmental contamination and development in eggs of the Common Snapping turtle (*Chelydra s. serpentina*) from Ontario, Canada. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A Current Issues*, 33(4), 521-547.

Bladow, R. A., & Milton, S. L. (2019). Embryonic mortality in Green (*Chelonia mydas*) and Loggerhead (*Caretta caretta*) sea turtle nests increases with cumulative exposure to elevated temperatures. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 518, 151180.

Bonfield, W., & Clark, E. A. (1973). Elastic deformation of compact bone. *Journal of Materials Science*, 8, 1590-1594.

- Bouchet, P. (2006). The magnitude of marine biodiversity. The exploration of marine biodiversity: scientific and technological challenges (1st ed.). Duante, C. M. (ed.), Fundaciòn BBVA, Bilbao, Spain, 31-62.
- Brunson, S., Gaos, A. R., Kelly, I. K., Van Houtan, K. S., Swimmer, Y., Hargrove, S., ... & Jones, T. T. (2022). Three decades of stranding data reveal insights into endangered Hawksbill sea turtles in Hawai‘i. *Endangered Species Research*, 47, 109-118.
- Cáceres-Farias, L., Reséndiz, E., Espinoza, J., Fernández-Sanz, H., & Alfaro-Núñez, A. (2022). Threats and vulnerabilities for the globally distributed Olive Ridley (*Lepidochelys olivacea*) sea turtle: A historical and current status evaluation. *Animals*, 12(14), 1837.
- Cadena, E. A., & Parham, J. F. (2015). Oldest known marine turtle? A new protostegid from the Lower Cretaceous of Colombia. *PaleoBios*, 32(1), 1-42.
- Carrier, D., & Leon, L. R. (1990). Skeletal growth and function in the California gull (*Larus californicus*). *Journal of Zoology*, 222(3), 375-389.
- Casale, P., & Heppell, S. S. (2016). How much sea turtle bycatch is too much? A stationary age distribution model for simulating population abundance and potential biological removal in the Mediterranean. *Endangered Species Research*, 29(3), 239-254.
- Cignoni, P., Callieri, M., Corsini, M., Dellepiane, M., Ganovelli, F., Ranzuglia, G. (2008). MeshLab: an Open-Source Mesh Processing Tool. *Sixth Eurographics Italian Chapter Conference*, 129-136.
- Crastz, F. (1982). Embryological stages of the marine turtle *Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz). *Revista de Biología Tropical*, 30(2), 113-120.
- Currey, J. D., & Butler, G. (1975). The mechanical properties of bone tissue in children. *Journal of Bone and Joint Surgery*, 57(6), 810-814.

Dragonfly 2022.2 [Computer software]. Comet Technologies Canada Inc., Montreal, Canada; software available at <https://www.theobjects.com/dragonfly>.

Duchene, S., Frey, A., Alfaro-Núñez, A., Dutton, P. H., Gilbert, M. T. P., & Morin, P. A. (2012). Marine turtle mitogenome phylogenetics and evolution. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 65(1), 241-250.

Fedorov, A., Beichel, R., Kalpathy-Cramer, J., Finet, J., Fillion-Robin, J-C., Pujol, S., Bauer, C., Jennings, D., Fennessy, F., Sonka, M., Buatti, J., Aylward, S.R., Miller, J.V., Pieper, S., Kikinis, R. (2012). 3D Slicer as an Image Computing Platform for the Quantitative Imaging Network. *Magnetic Resonance Imaging*. 30(9):1323-41. PMID: 22770690.

Fischer-Rousseau, L., Cloutier, R., & Zelditch, M. L. (2009). Morphological integration and developmental progress during fish ontogeny in two contrasting habitats. *Evolution & Development*, 11(6), 740-753.

Frazer, N. B. (1992). Sea turtle conservation and halfway technology. *Conservation Biology*, 6(2), 179-184.

Golden, E. J. (2016). Sea Turtle Response to Climate Change: Analyzing Current and Predicting Future Impacts on Populations, Habitat, and Prey Populations. Senior Honors Thesis, University of New Hampshire, Durham.

Gray, J. (2023). Green Sea Turtle Skull Anatomy. Blackburn Lab, University of Florida's Florida Museum of Natural History. Available on Sketchfab. URL <https://sketchfab.com/3d-models/green-sea-turtle-skull-anatomy-ea2164e905834ab39ca5536b60048f3b>.

Grünbaum, T., Cloutier, R., & Vincent, B. (2012). Dynamic skeletogenesis in fishes: insight of exercise training on developmental plasticity. *Developmental Dynamics*, 241(10), 1507-1524.

- Hays, G. C., Mackay, A., Adams, C. R., Mortimer, J. A., Speakman, J. R., & Boerema, M. (1995). Nest site selection by sea turtles. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 75(3), 667-674.
- Heyer, D. B., & Meredith, R. M. (2017). Environmental toxicology: Sensitive periods of development and neurodevelopmental disorders. *Neurotoxicology*, 58, 23-41.
- Hirayama, R. (1998). Oldest known sea turtle. *Nature*, 392(6677), 705-708.
- Horton, R. (1989). Canopy shading effects on soil heat and water flow. *Soil Science Society of America Journal*, 53(3), 669-679.
- Hosmer, D. W., Hosmer, T., Le Cessie, S., & Lemeshow, S. (1997). A comparison of goodness-of-fit tests for the logistic regression model. *Statistics in Medicine*, 16(9), 965-980.
- IUCN. (2023). The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2022-2.
- Laloë, J. O., Cozens, J., Renom, B., Taxonera, A., & Hays, G. C. (2017). Climate change and temperature-linked hatchling mortality at a globally important sea turtle nesting site. *Global Change Biology*, 23(11), 4922-4931.
- Lecointre, G., & Le Guyader, H. (2017). Classification phylogénétique du vivant (4th ed., vol. 2). *Éditions Belin*, Paris.
- Li, C., Wu, X. C., Rieppel, O., Wang, L. T., & Zhao, L. J. (2008). An ancestral turtle from the Late Triassic of southwestern China. *Nature*, 456(7221), 497-501.
- Linnaeus, C. V. (1766). *Systema naturæ per regna tria naturæ, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis. Tomus I. Editio duodecima, reformata.*

Meylan, A. B., & Donnelly, M. (1999). Status justification for listing the Hawksbill turtle (*Eretmochelys imbricata*) as critically endangered on the 1996 IUCN Red List of Threatened Animals. *Chelonian Conservation and Biology*, 3(2), 200-224.

Miller, J. D. (1985). Embryology of marine turtles. *Biology of the Reptilia*, 14, 269-328.

Miller, J. D., Mortimer, J. A., & Limpus, C. J. (2017). A field key to the developmental stages of marine turtles (Cheloniidae) with notes on the development of *Dermochelys*. *Chelonian Conservation and Biology*, 16(2), 111-122.

Naro-Maciel, E., Le, M., FitzSimmons, N. N., & Amato, G. (2008). Evolutionary relationships of marine turtles: a molecular phylogeny based on nuclear and mitochondrial genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 49(2), 659-662.

Packard, G. C., & Packard, M. J. (1984). Coupling of physiology of embryonic turtles to the hydric environment. *Respiration and Metabolism of Embryonic Vertebrates: Satellite Symposium of the 29th International Congress of Physiological Sciences, Sydney, Australia, 1983* (pp. 99-119). Dordrecht: Springer Netherlands.

Patrício, A. R., Varela, M. R., Barbosa, C., Broderick, A. C., Catry, P., Hawkes, L. A., ... & Godley, B. J. (2019). Climate change resilience of a globally important sea turtle nesting population. *Global Change Biology*, 25(2), 522-535.

Perrault, J. R., Miller, D. L., Eads, E., Johnson, C., Merrill, A., Thompson, L. J., & Wyneken, J. (2012). Maternal health status correlates with nest success of Leatherback sea turtles (*Dermochelys coriacea*) from Florida. *PLoS ONE*, 7(2), e31841.

Pfäller, J. B., Chaloupka, M., Bolten, A. B., & Bjorndal, K. A. (2018). Phylogeny, biogeography and methodology: a meta-analytic perspective on heterogeneity in adult marine turtle survival rates. *Scientific Reports*, 8(1), 5852.

Quammen, D. (2011). The song of the dodo: island biogeography in an age of extinctions. *Simon and Schuster*, New York, New York.

- R Core Team (2022). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Rieppel, O. (1993). Studies on skeleton formation in reptiles: patterns of ossification in the skeleton of *Chelydra serpentina* (Reptilia, Testudines). *Journal of Zoology*, 231(3), 487-509.
- Ritz, C., Baty, F., Streibig, J. C., Gerhard, D. (2015). Dose-Response Analysis Using R. *PLoS ONE*, 10(12), e0146021.
- RStudio Team (2022). RStudio : Integrated Development Environment for R. RStudio, PBC, Boston, MA. URL <http://www.rstudio.com/>.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., ... Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676–682.
- Sheil, C. A. (2003). Skeletal development in turtles: patterns of ossification through ontogeny in *Apalone spinifera*, *Chelydra serpentina*, *Macrochelys temminckii*, and *Eretmochelys imbricata* (Reptilia: Testudinata). Ph.D. thesis, The University of Kansas.
- Sheil, C. A. (2013). Development of the skull of the Hawksbill sea turtle, *Eretmochelys imbricata*. *Journal of Morphology*, 274(10), 1124-1142.
- Soslau, G., Spotila, J. R., Chun, A., Yi, S., & Weber, K. T. (2011). Potentially lethal bacteria in Leatherback turtle eggs in the wild threaten both turtles and conservationists. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 410, 101-106.
- Spotila, J.R. (2004). Sea Turtles: A Complete Guide to Their Biology, Behavior and Conservation. *The Johns Hopkins University Press and Oakwood Arts*, Baltimore, Maryland.
- Standora, E. A., & Spotila, J. R. (1985). Temperature dependent sex determination in sea turtles. *Copeia*, 711-722.

Stephenson, M. L. (2014). The effects of ocean acidification on Hawksbill sea turtles (*Eretmochelys imbricata*): An ecosystem approach. *Indian Ocean Turtle Newsletter*, 19, 5-8.

Szabo, E., Bensusan, J., Akkus, O., & Rimnac, C. (2024). Immature porcine cortical bone mechanical properties and composition change with maturation and displacement rate. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 153, 106487.

Taylor, W., & Van Dyke, G. (1985). Revised procedures for staining and clearing small fishes and other vertebrates for bone and cartilage study. *Cybium*, 9, 107-121.

Thomson, S. A. (2021). Turtles of the world: annotated checklist and atlas of taxonomy, synonymy, distribution, and conservation status. *Journal of Herpetology*, 20(2), 225-228.

Torzilli, P. A., Takebe, K., Burstein, A. H., Zika, J. M., & Heiple, K. G. (1982). The material properties of immature bone. *Journal of Biomechanical Engineering*, 104(1), 12-20.

Van Houtan, K. S., Francke, D. L., Alessi, S., Jones, T. T., Martin, S. L., Kurpita, L., ... & Baird, R. W. (2016). The developmental biogeography of hawksbill sea turtles in the North Pacific. *Ecology and Evolution*, 6(8), 2378-2389.

Vermeij, G. J., & Motani, R. (2018). Land to sea transitions in vertebrates: the dynamics of colonization. *Paleobiology*, 44(2), 237-250.

Wassersug, R. J. (1976). A procedure for differential staining of cartilage and bone in whole formalin-fixed vertebrates. *Stain Technology*, 51(2), 131-134.

Whitmore, C. P., & Dutton, P. H. (1985). Infertility, embryonic mortality and nest-site selection in Leatherback and Green sea turtles in Suriname. *Biological Conservation*, 34(3), 251-272.

Wood, D. W., & Bjorndal, K. A. (2000). Relation of temperature, moisture, salinity, and slope to nest site selection in Loggerhead sea turtles. *Copeia*, 2000(1), 119-128.

Wyneken, J. (2001). The anatomy of sea turtles. *US Department of Commerce, NOAA Tech. Memor* (pp. 1-172). NMFS-SEFSC-470.

Wyneken, J. (2003). The external morphology, musculoskeletal system, and neuro-anatomy of sea turtles. *The Biology of Sea Turtles; Lohmann, KJ, Musick, JA, Wyneken, J., Eds*, 39-78.

Yntema, C. L., & Mrosovsky, N. (1982). Critical periods and pivotal temperatures for sexual differentiation in Loggerhead sea turtles. *Canadian Journal of Zoology*, 60(5), 1012-1016.

Zeileis, A., Kleiber, C., Jackman, S. (2008). Regression Models for Count Data in R. *Journal of Statistical Software*. 27(8). URL <http://www.jstatsoft.org/v27/i08/>.

Zou, K. H., Hall, W. J., & Shapiro, D. E. (1997). Smooth non-parametric receiver operating characteristic (ROC) curves for continuous diagnostic tests. *Statistics in Medicine*, 16(19), 2143-2156.

