

Paléontologie / Palaeontology
(Paléontologie des Vertébrés / Vertebrate Palaeontology)

Histomorphogenesis of embryos of Upper Jurassic Theropods from Lourinhã (Portugal)

Armand de Ricqlès^{a,*}, Octávio Mateus^{b,c}, Miguel Telles Antunes^{b,d}, Philippe Taquet^{d,e}

^a ER « Formations squelettiques », UMR CNRS 8570 et Collège de France, université Paris-7, case 7077, 2, place Jussieu, 75251 Paris cedex 05, France

^b Centro de Estudos Geológicos, Faculdade de Ciências e Tecnologia (Universidade Nova de Lisboa), Quinta da Torre, 2825-114 Caparica, Portugal

^c GEAL, Museu da Lourinhã, Rua João Luis de Moura, 2530 Lourinhã, Portugal

^d Academia das Ciências de Lisboa, Lisboa, Portugal

^e Institut de paléontologie du Muséum national d'histoire naturelle, UMR CNRS 8569, 8, rue Buffon 75005 Paris, France

Received 28 February 2001; accepted 28 February 2001

Communicated by Philippe Taquet

Abstract – Remains of dinosaurian embryos, hatchlings and early juveniles are currently the subject of increasing interest, as new discoveries and techniques now allow to analyse palaeobiological subjects such as growth and life history strategies of dinosaurs. So far, available ‘embryonic’ material mainly involved Ornithopods and some Theropods of Upper Cretaceous age. We describe here the histology of several bones (vertebrae, limb bones) from the tiny but exceptionally well preserved *in ovo* remains of Upper Jurassic Theropod dinosaurs from the Paimogo locality near Lourinhã (Portugal). This Jurassic material allows to extend in time and to considerably supplement in great details our knowledge of early phases of growth in diameter and in length of endoskeletal bones of various shape, as well as shape modelling among carnivorous dinosaurs. Endochondral ossification in both short and long bones involves extensive pads of calcified cartilages permeated by marrow buds. We discuss the likely occurrence of genuine cartilage canals in dinosaurs and of an avian-like ‘medullary cartilaginous cone’ in Theropods. Patterns of periosteal ossification suggest high initial growth rates ($20 \mu\text{m}\cdot\text{day}^{-1}$ or more), at once modulated by precise and locally specific changes in rates of new bone deposition. The resulting very precise shape modelling appears to start early and to involve at once some biomechanical components.
© 2001 Académie des sciences / Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS

histology and bone growth dynamics / dinosaurs / Theropods / embryos / Jurassic

Résumé – **Histomorphogénèse du squelette d’embryons de dinosaures Théropodes du Jurassique supérieur de Lourinhã (Portugal)**. Les restes de dinosaures à l’état d’embryons, de nouveau-nés et de juvéniles sont actuellement l’objet d’un intérêt soutenu, car ce type de matériel permet d’analyser la paléobiologie des dinosaures, en particulier la croissance et les traits d’histoire de vie. Le matériel disponible jusqu’à présent comprenait principalement des restes d’embryons et de juvéniles d’Ornithopodes et de quelques Théropodes du Crétacé supérieur. Nous décrivons ici l’histologie osseuse d’embryons *in ovo* de Théropodes (dinosaures carnivores) du Jurassique supérieur du gisement de Paimogo près de Lourinhã (Portugal). Ce matériel jurassique permet de reculer dans le temps et d’augmenter de façon détaillée notre connaissance de l’ostéogénèse précoce et de l’acquisition de la forme, chez les dinosaures carnivores, par l’analyse des croissances diamétrale et

* Correspondence and reprints.

E-mail addresses: Ricqlès@ccr.jussieu.fr (A. de Ricqlès), taquet@cimrs1.mnhn.fr (P. Taquet).

longitudinale dans des os endosquelettiques de morphologies variées. © 2001 Académie des sciences / Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS

histologie et dynamique de croissance osseuse / dinosaures / Théropodes / embryons / Jurassique

Sumário – Restos de dinossauros – embriões, recém-nascidos e indivíduos muito jovens – têm vindo a suscitar crescente interesse; novas descobertas e novas técnicas permitem actualmente analisar temas de índole palaeobiológica tais como o crescimento e as estratégias da história de vida dos dinossauros. Até agora, o material embriológico disponível dizia respeito, sobretudo, a Ornitópodos e alguns Terópodes do Cretácico superior. Descrevemos nesta nota a histologia de vários ossos (vértebras, ossos dos membros) a partir de restos minúsculos mas excepcionalmente bem preservados *in ovo*, de dinossauros terópodes do Jurássico superior de Paimogo, perto da Lourinhã. Este material jurássico permite ampliar no tempo e muito acrescentar, com pormenores numerosos, no que concerne ao conhecimento das primeiras fases do crescimento (em diâmetro e comprimento) de ossos endoesqueléticos de forma variada. Permite, também, aprofundar o conhecimento da modelação da forma de dinossauros carnívoros. A ossificação endocranal envolve, em ossos curtos e longos, extensas almofadas de cartilagem calcificada infiltrada por “botões” de medula. Discutimos a provável ocorrência de verdadeiros canais de cartilagem em dinossauros e, em Terópodes, de um “cone cartilaginoso medular” à semelhança das aves. Os padrões de ossificação periosteal sugerem altas velocidades iniciais de crescimento ($20 \mu\text{m}\cdot\text{dia}^{-1}$, ou mais), moduladas, desde logo, por modificações precisas e localmente específicas das velocidades de deposição de osso novo. Daí resulta modelação muito precisa da forma, a qual parece começar cedo e envolver, desde então, alguns componentes biomecânicos. © 2001 Académie des sciences / Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS

histologia e dinâmica de crescimento ósseo / dinosauros / Terópodes / embriões / Jurássico

Version abrégée

1. Ossification périostique et croissance diaphysaire

Les restes de dinosaures à l'état d'embryons, de nouveau-nés et de juvéniles dont l'histologie osseuse est présentée ici appartiennent à des Théropodes (dinosaures carnivores) du Jurassique supérieur du gisement de Paimogo, près de Lourinhã (Portugal) [26]. Les corticales sont caractéristiques d'un « os embryonnaire », de texture très lacunaire. Le cortex, entièrement primaire, est constitué de travées osseuses minces laissant entre elles des espaces vasculaires nombreux, de telle sorte que la porosité est élevée – au moins 50 % – (figure 2.4). Les travées sont formées d'un tissu osseux généralement isotrope en lumière polarisée et à grosses logettes périostéocytaires. Il n'y a pas encore de dépôt d'os lamellaire d'ostéones (figure 2.1). Certains os (ou régions osseuses) présentent une organisation très régulièrement concentrique des travées, déterminant une disposition laminaire ; d'autres os ou régions ont, au contraire, une organisation spatiale très irrégulière, produisant un patron réticulaire [7, 8, 12] (figure 2.5). De nombreux phénomènes de dérive latérale de la cavité médullaire sont à mettre en rapport avec des croissances différentes sur les faces opposées de l'os. En général, la périphérie de la cavité médullaire montre des signes clairs de résorption (lacunes de Howship), signant l'accroissement de son diamètre aux dépens du cortex profond. Selon les os et les régions, la cavité médullaire est libre de travées osseuses (diaphyse tubulaire) ou présente une spongiosa, formée de fines travées

endostéales irrégulières. L'os périostique cortical est comparable ou identique à celui des oiseaux aux stades proches de l'éclosion et suggère une vitesse d'ostéogenèse élevée en direction radiaire, au moins de l'ordre de $20 \mu\text{m}\cdot\text{j}^{-1}$.

2. Ossification enchondrale et croissance épiphysaire

Les extrémités des os longs sont toutes constituées par une couche bien développée de cartilage calcifié, plus ou moins hypertrophié (figure 1.1). Ce cartilage est parcouru par une série de tubes allongés, en relation avec la cavité médullaire primitive ou avec la surface conservée de l'épiphyse [19, 20] (figure 1.2) et disposés longitudinalement. Certains de ces espaces tubulaires proviennent de la moelle osseuse et fonctionnent comme des baies d'érosion pénétrant dans le cartilage en direction épiphysaire. Leurs parois sont localement le siège d'une érosion du cartilage, associée à un mince dépôt d'os enchondral [1, 3, 19, 20] (figure 2.3). En direction diaphysaire, l'élargissement et la confluence des baies d'érosion conduit à une structure de spongiosa. Des îlots de cartilage calcifié, ou des *globuli ossei*, peuvent être observés dans l'épaisseur des travées osseuses. Dans l'ensemble, les images histologiques sont très comparables à celles observées chez les jeunes oiseaux en croissance. Les tubes situés le plus distalement au sein du cartilage, en position épiphysaire, pourraient correspondre à de véritables canaux du cartilage tels qu'ils sont développés chez les oiseaux, plutôt qu'à de simples baies d'érosion d'origine médullaire. Un argument en faveur de cette interprétation est l'accroissement de diamètre de ces canaux

en direction de la surface épiphysaire (*figures 1.1 et 1.2*). Toutefois, la présence fréquente d'un mince dépôt osseux enchondral à la périphérie de ces structures indique que, si ces tubes sont bien originellement des canaux du cartilage, ils ont déjà été colonisés par les éléments conjonctivo-vasculaires en provenance de la moelle au stade ontogénique observé [15, 19, 20, 40]. Certaines régions de la métaphyse présentent une grande lacune centrale, occupée par du sédiment et pouvant contenir localement de modestes îlots de cartilage. Ceci suggère l'existence d'un « cône cartilagineux médullaire » de type avien [15], principalement constitué de cartilage non calcifié (et donc pas conservé par la fossilisation), dont la présence a déjà été suggérée chez le Théropode crétacé *Troodon* [20, 38, 39].

3. Différenciations régionales et modelage de la forme

La différence morphologique entre os courts (vertèbres) et os longs (membres) apparaît directement corrélée à l'épaisseur du cartilage calcifié conservé chez le fossile (elle-même sans doute proportionnelle à celle du cartilage de croissance non minéralisé – non conservé), à la disposition des baies d'érosion intracartilagineuses et enfin aux vitesses relatives des ossifications périostiques et enchondrales [2, 20, 22, 30, 36, 37]. Dans le fémur, la différenciation d'une tête fémorale fortement excentrée latéralement est assurée par une région de résorption métaphysaire spécifique, parfaitement différenciée dès le stade observé. Les structures de l'extrémité proximale du fût fémoral diffèrent clairement de celles du grand trochanter interne. Il est également possible d'observer les détails histologiques responsables de la mise en place du trochanter interne (*figure 2.2*) et du quatrième trochanter. Enfin, certaines structures des spongieuses dans la métaphyse proximale du fémur présentent une organisation spatiale de leurs travées se répartissant localement en une série de V ou W, l'ensemble évoquant quelque peu une structure « en poutre de Warren » (*figure 2.2*). Ce squelette osseux semble donc se différencier très précocement sous contraintes biomécaniques, qui sont d'emblée « intégrées » dans sa structure même.

4. Conclusions

Les types de tissus périostiques constituant les diaphyses des os longs et, dans une moindre mesure, les parois latérales des vertèbres sont typiques d'un os « foetal » ou « embryonnaire » de nature primaire (non remaniée), hypervascularisé et susceptible d'être déposé à très grande vitesse [7, 8]. Les structures épiphysaires évoquent également, au moins pour les os longs, la possibilité d'une croissance longitudinale extrêmement active [1–3, 40]. La présence probable de canaux du cartilage et d'un cône cartila-

gineux médullaire suggère un rapprochement de ces Théropodes avec la condition des os longs des oiseaux [20], en accord avec des conclusions phylogénétiques obtenues sur des critères indépendants [13, 29].

Enfin, un des aspects les plus remarquables des « embryons » de Théropodes jurassiques de Lourinhã, outre leur excellente qualité de conservation, est la précision des détails anatomiques spécifiques de chaque os et région osseuse. Ces détails (*figures 1.7, 1.8 et 2.2*) préfigurent déjà, à échelle réduite, des caractéristiques anatomiques qui sont propres aux Théropodes, mais qui avaient été auparavant observées et décrites sur des spécimens adultes, dont la taille peut varier d'un facteur 100 par rapport à celle des os embryonnaires. Bien entendu, la construction histologique de ces détails anatomiques diffère entièrement chez l'embryon et chez l'adulte, mais le maintien des caractéristiques morphologiques tout au long de la « trajectoire ontogénique » est frappant. Ceci suggère que le contrôle (génétique) s'exerçant sur la forme est à la fois puissant, précoce et permanent, ce qui n'est pas contradictoire avec l'influence d'une « mécanomorphose » (épigénétique) suggérée ci-dessus. Malgré la précision des détails anatomiques mis en place dès le stade embryonnaire étudié, l'absence d'une série de croissance ne permet pas de savoir si ces détails se conservent le long de la « trajectoire ontogénique » selon une relation d'iso- ou d'allométrie, et donc d'en déduire la morphologie adulte finale. Toutefois, une analyse bivariée des corps vertébraux chez *Allosaurus*, *Lourinhanosaurus* et les embryons révèle des proportions identiques des centra chez les embryons et *Lourinhanosaurus*, alors qu'elles diffèrent chez les embryons et *Allosaurus*. Sous l'hypothèse d'une croissance isométrique des vertèbres, les embryons pourraient donc être rapportés au genre portugais sur ce critère. Cette hypothèse pourrait être testée par la mise en évidence d'une croissance isométrique des centra chez un théropode pour lequel une série de croissance est connue, tel *Allosaurus* de la Cleveland Lloyd Quarry. L'analyse du statut systématique des embryons devra aussi tenir compte du fait que plusieurs types de Théropodes adultes sont désormais connus à proximité [24, 25].

En résumé : (1) la typologie de l'os d'apposition périostique suggère des taux initiaux de croissance radiale très élevés (au moins $20 \mu\text{m}\cdot\text{j}^{-1}$); (2) l'ossification enchondrale met en jeu, dans les os longs et courts, d'importantes régions de cartilage calcifié, plus ou moins envahies par des bourgeons médullaires, selon des modalités proches de celles observées chez les oiseaux et suggérant également une croissance longitudinale rapide; (3) de même, la présence de véritables canaux du cartilage chez les dinosaures et d'un « cône cartilagineux médullaire » chez les Théropodes est probable; (4) le modelage précis de la forme semble se mettre en place très précocement et intégrer d'emblée des composantes biomécaniques.

1. Introduction

During the last ten years or so, the value of bone histology to interpret palaeobiological issues such as growth dynamics and life history traits among fossil vertebrates has been widely recognized [4, 12]. This is especially true for the study of (non-avian) dinosaurs [10, 31–33]. However, such studies have been traditionally hampered by several circumstantial factors, including availability of fossil material, intrinsic bone tissue variability within the skeleton, lack of standardization of techniques and vocabulary [34]. Accordingly, few studies, so far, could benefit from complete growth series [19] or could analyse important factors of histological variability linked to anatomical sampling [18]. On the other hand, the increasing number of discoveries of juvenile dinosaurs and of *in ovo* material has allowed research to focus on issues of dinosaurs growth and life history strategies, in connection with hotly debated issues such as dinosaur physiology and the close phylogenetic relationships of Theropods to birds [5, 13, 29]. This has stimulated much needed comparative and experimental studies of modern animals (notably birds) histogenesis, in order to get quantitative values on the relationship between bone tissues typologies and growth rates, as a basis towards extrapolation to fossil material via simple uniformitarian hypotheses [7, 8].

‘Dinosaur embryos’ have been recognized for a long time [35], but modern research has unveiled *in ovo* or presumably hatchling material in unprecedented number and diversity [5]. However, most of the material so far studied is of Upper Cretaceous age and belongs to Ornithopods (dryosaurs, hypsilophodontids, hadrosaurids, and others), although some sauropod (titanosaur?), troodontid and oviraptorid and therizinosaur embryonic material have also been described [1, 3, 9, 14, 16, 17, 28, 38, 39].

According to palaeontological practice, we will use here the term ‘embryos’ in a wide sense [5] to describe fossil skeletal material found *in ovo*, regardless of the fact that this material, in all likelihood, is not very far from the hatchling period and has far overpassed the actual embryonic stage of ontogenetic development, as defined by embryologists.

The discovery of exquisitely preserved dinosaur embryos in Paimogo, near the city of Lourinhã, north of Lisbon (Portugal) [26] is an event of unprecedented interest for the study of early ontogeny of dinosaurs for several reasons. First the material is of Upper Jurassic age [26, 27], which extends the temporal range of ‘dinosaurian embryology’ almost 80 million years back. Second, the material belongs to the Theropodan clade, the spectacular bipedal carnivorous dinosaurs now widely regarded as closely linked to the ancestry of birds [13, 29]. In view of the incred-

Table. Material and thin sections used for the histological study presented here.

Tableau. Liste du matériel étudié histologiquement et sections (lames minces) présentées dans ce travail.

Undetermined long bone shafts (stylo- or zeugopodials) / Os longs indéterminés (diaphyses : éléments stylo- ou zeugopodiens)	
98.1	2 cross-sections / 2 sections transversales
98.2	6 cross-sections / 6 sections
98.3	3 cross-sections / 3 sections
98.4	3 cross-sections / 3 sections
98.5	4 cross-sections / 4 sections
Determined long bones / Os longs déterminés	
84.1 : right femur proximal half / moitié proximale fémur droit	5 longitudinal sections of epiphysis / 5 sections longitudinales de l'épiphysse 3 cross-sections of shaft / 3 sections transversales de la diaphyse
101.1 : right femoral shaft / diaphyse fémur droit	4 cross-sections / 4 sections transversales
110.1 : femur proximal region / région proximale fémur	6 longitudinal sections of epiphysis / 6 sections longitudinales de l'épiphysse 3 cross-sections of metaphysis / 3 sections transversales de la métaphysse
Vertebrae / Vertèbres	
99.1 : dorsal (?) vertebrae / vertèbre (dorsale ?)	9 cross-sections of centrum / 9 sections transversales du centrum
99.2 : vertebra / vertèbre	6 cross-sections of centrum / 6 sections transversales du centrum
99.3 : vertebra / vertèbre	8 cross-sections of centrum / 8 sections transversales du centrum
99.4 : caudal (?) vertebra / vertèbre (caudale ?)	6 longitudinal sections of centrum / 6 sections longitudinales du centrum

ible amount of minute information brought by the histological study of such a material, it is not within the scope of this paper to deal with detailed descriptions. Accordingly, only the most salient aspects need to be pointed out here.

2. Materials and methods

Lourinhã's embryos are most often found as tiny isolated skeletal elements within eggs or in close association with them, within the matrix between the eggs of clutches (or clutch clusters) discovered in 1993 [26]. Published data [26, 27] and works currently in progress demonstrate that the embryos are Theropods and morphological details allow to put them close to *Allosaurus*. A smallish-sized allosauroid (perhaps an incompletely grown individual) has been discovered just six kilometres from the Paimogo eggs locality in contemporaneous layers (Sobral unit: Late Kimmeridgian/Tithonian) and described as *Lourinhanosaurus* [23]. A bivariate analy-

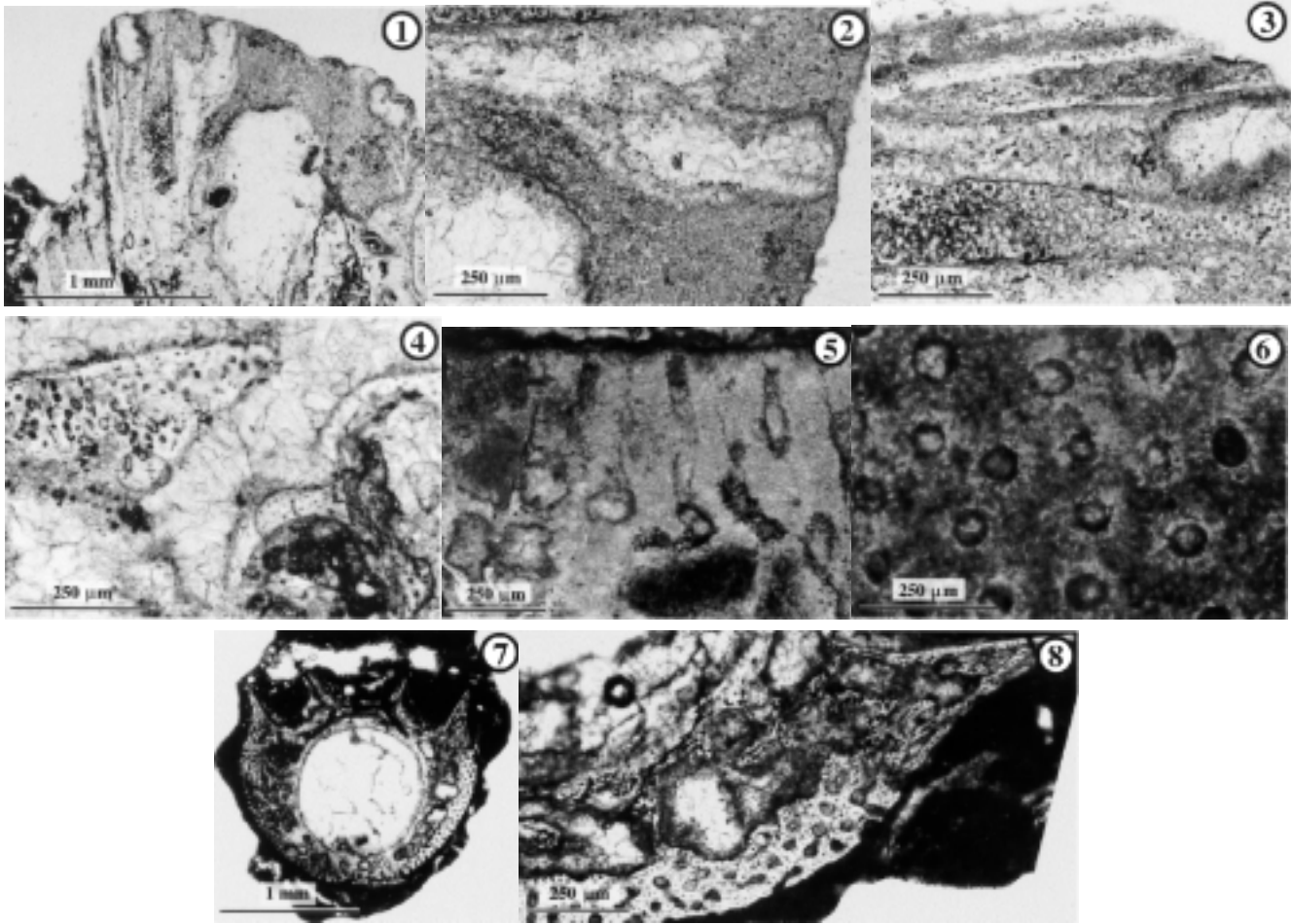


Figure 1. 1. Longitudinal section in the proximal femoral epiphysis. General view; internal trochanter on the left. Section 84.1.2.L. 2. Idem, detail of a region of the epiphyseal end formed by calcified cartilage crossed by transphyseal canals expanding towards the surface. 3. Idem, another region of the epiphyseal end. Hypertrophied calcified cartilage and thin endochondral bone deposition at the periphery of the transphyseal canals. 4. Longitudinal section in the proximal femoral epiphysis. Detail in the epiphysis–metaphysis region of transition. Marrow cavities have been filled up by matrix (calcite), which has preserved in situ local endochondral bone trabeculae (right) and an island of early-differentiated calcified cartilage (left), a likely evidence of the occurrence in vivo of a ‘cartilagineous medullary cone’. Section 84.1.4.L. 5. Vertebra. Longitudinal section in the centrum, close to the ‘epiphysal’ surface facing the next vertebra. Calcified cartilage crossed by short transphyseal canals linked to early endochondral ossification. Section 99.3.6.L. 6. Vertebra. Cross-section of the centrum close to the ‘epiphysal’ surface. Detail of numerous transphyseal canals, some of them being already involved into the early deposition of endochondral bone. Section 99.1.8.T. 7. Vertebra. General view of a centrum cross-section close to its centre. A wide chordal canal is surrounded by an inner endochondral cortex and an outer periosteal cortex. The base of vertebral apophyses (or insertion of neural arches) is still made of calcified cartilage. Section 99.1.6.T. 8. Idem, detail of the periosteal cortex forming the lateral wall of the centrum and of the endochondral material forming the periphery of the chordal canal.

Figure 1. 1. Extrémité proximale du fémur, section longitudinale dans l'épiphyse. Vue générale. Le trochanter interne est à gauche. Section 84.1.2.L. 2. Idem, détail d'une région de l'extrémité épiphysaire. Cartilage calcifié parcouru par des canaux transphysaires, accroissant leur diamètre en direction de la surface épiphysaire. 3. Idem, autre région de l'extrémité épiphysaire. Cartilage calcifié hypertrophié et mince dépôt endochondral à la périphérie des canaux transphysaires. 4. Extrémité proximale du fémur, section longitudinale. Détail de la région épiphyso-métaphysaire. Espaces « médullaires » remplis de calcite ayant respecté in situ des travées osseuses enchondrales (à droite) et îlot résiduel de cartilage calcifié peu hypertrophié (à gauche), témoignage probable de la présence in vivo d'un « cône cartilagineux médullaire ». Section 84.1.4.L. 5. Vertèbre, section longitudinale dans le centrum au niveau de la surface « épiphysaire », affrontée à la vertèbre suivante. Cartilage calcifié traversé par de courts canaux transphysaires initiant l'ossification endochondrale. Section 99.3.6.L. 6. Vertèbre. Section transversale du centrum près de la surface « épiphysaire ». Détail des nombreux canaux transphysaires, dont certains sont déjà associés à un début d'ossification endochondrale. Section 99.1.8.T. 7. Vertèbre. Vue générale d'une section transversale du centrum dans sa région moyenne. Le vaste canal chordal est entouré par un cortex profond d'origine endochondrale et par un cortex superficiel d'origine périostique. La base des apophyses (ou régions d'insertion des arcs neurax) est encore formée de cartilage calcifié. Section 99.1.6.T. 8. Idem, détail du cortex périostique formant la paroi latérale externe du centrum et du matériel enchondral périchordal situé plus en profondeur.

sis of the proportions of the embryo's vertebral centra strongly supports affinities with this genus rather than with e.g. *Allosaurus*. However, for reasons discussed

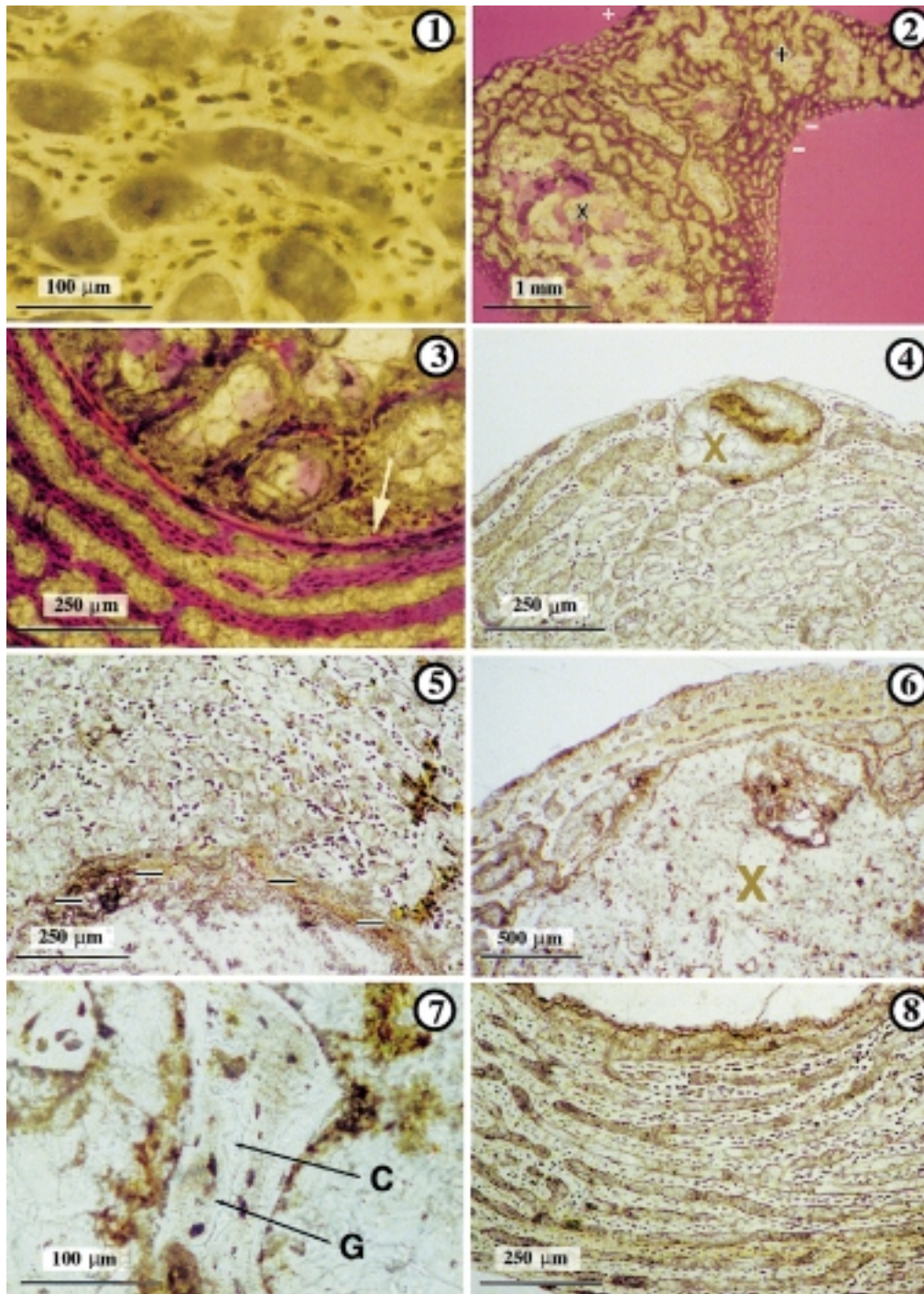
below, it is still safer not to refer the eggs and embryos to this or another taxon at the genus and species ranks.

After anatomical study, measurements and photography, the bone fragments selected for the histological study were embedded in epoxy resin and serially sawed on a thin low speed diamond powder disk. The sections were then ground and polished and observed under the compound microscope in ordinary and polarized light [41]. Six undetermined long bone shafts (cross sections), three femora and four vertebrae (lon-

gitudinal and cross sections) were used, yielding a total of seventy thin sections (*table*).

3. Periosteal bone ossification and growth in diameter of the shaft

All shaft cross-sections show a bony cortex quite typical of 'embryonic bone' surrounding a more or



less well-marked marrow cavity (*figure 2.8*). The cortex, entirely formed by primary (not reconstructed) bone, is organized in a variable number of thin trabeculae set apart from each others by numerous vascular spaces, so as to form a rather cancellous or spongy tissue – porosity at least 50 % – (*figure 2.4*). Bone trabeculae are composed of a bone matrix isotropic under polarized light, with rather plump cell lacunae. Deposition of primary osteonal bone is still entirely lacking. The shape, number and organization of the bone trabeculae are quite variable from bone to bone and even on the same section. Some have a very regularly concentric orientation, inducing a laminar organization [7, 8, 12] of the cortex (*figure 2.8*), others have a quite irregular pathway, inducing a reticular organization of the tissue [7, 8, 12] (*figure 2.5*). Lateral drift of the marrow cavity is often obvious, producing an offsetting relative to the cortex, itself growing asymmetrically to match the lateral drift. Generally, the periphery of the marrow cavity shows clear images of resorption (Howship's lacunae), evidence for its diametral growth by erosion of the innermost cortex, whose vascular spaces open directly in the marrow cavity (*figure 2.5*). The marrow cavity may be free of bony trabeculae, giving to the bone the tubular structure diagnostic of Theropods [29] (*figure 2.8*). However, some sections

have a well-developed system of cancellous bony trabeculae within the marrow cavity. They are quite distinct from the periosteal bony trabeculae of the surrounding cortex and are the result of the initial endochondral ossification within the shaft of the former cartilaginous *anlage* (*figure 2.3*). Indeed, within some trabeculae, *globuli ossei* close to the tiny remnants of calcified cartilage matrix are still left, supporting their early endochondral origin [12]. On such sections, the place of the Kastchenko's line [12], marking the periphery of the initial cartilaginous *anlage*, before the onset of periosteal ossification on the shaft, could still be deciphered.

At the periphery of the cortex, the vascular canals also freely open into the sub periosteal space (*figure 2.4*), and the outermost bone trabeculae form protruding spikes, evidence of new forming bone being actively laid down at the periphery to allow bone diametral growth and compensate for the marrow cavity increase in diameter [7, 8] (*figure 2.5*).

4. Endochondral ossification and longitudinal growth

The ends of the long bones are all formed by a well-developed coating of hypertrophied calcified cartilage (*figures 1.1–1.3*). This cartilage contains a great

Figure 2. 1. Cross section of the shaft of an undetermined long bone. Detail of the periosteal bone cortex. The bone is laid down as fine trabeculae spread apart by wide vascular spaces. Periosteocytic lacunae are numerous and exhibit extensive canalicular development. No osteonal bone deposition. Section 98.5.1.T. **2.** Proximal end of a femur. Cross-section through the main shaft (×) and the internal trochanter (+). The medullary cavity in the shaft (×) was likely filled up in vivo by the 'cartilaginous medullary cone'. It is surrounded by endochondral trabeculae with *globuli ossei* (cf. *figure 2.7*), themselves surrounded by a thin periosteal cortex (cf. *figure 2.6*). The concave surface of the trochanter experiences resorption – and the convex phase apposition +. The inner trabeculae in the trochanter start to get spatial orientation. Section 110.1.3.T. **3.** Cross-section of the shaft of an undetermined long bone. The marrow cavity contains numerous thin endosteo-endochondral trabeculae. Kastchenko's line (arrow) marks the limit of the cartilaginous *anlage* surrounded by the deep periosteal cortex. Section 98.4.1.T. **4.** Cross-section of femoral shaft. External cortex of periosteal origin made of fine trabeculae set apart by wide vascular spaces (cf. *figure 2.1*). Incorporation into the cortex of a large oblique nutrient canal (×). Section 101.1.0.T. **5.** Cross-section of femoral shaft. Deep periosteal cortex with an irregular trabecular organisation, destroyed by perimedullar erosion (–). Section 110.1.3.T. **6.** Cross section of femoral metaphysis. The central cavity (×, likely filled in vivo by the cartilaginous medullary cone) is lined outwardly by endochondral trabeculae and erosion bays, altogether encircled by a thin periosteal cortex. Section 110.1.2.T. **7.** Idem, detail of an endochondral bone trabecle containing *globuli ossei* (G) lining tiny remains of cartilage (C). **8.** Femoral shaft cross section. Overview of the cortex forming a tube lining a free marrow cavity. The well-vascularised primary periosteal cortex is here organized into a fairly regular system of circumferential laminae (compare with *figure 2.4*). Section 101.1.0.T.

Figure 2. 1. Diaphyse d'un os long indéterminé. Section transversale. Détail du cortex périostique. L'os est déposé en fines travées irrégulières séparées par d'importants espaces vasculaires. Nombreuses logettes périostéocytaires, à réseau canaliculaire bien développé. Pas de dépôt ostéonal. Section 98.5.1.T. **2.** Région épiphysaire proximale d'un fémur. Section transversale passant par le fût osseux principal (×) et par le trochanter interne (+). La cavité osseuse métaphysaire (×), probablement occupée in vivo par le cône cartilagineux médullaire, est entourée de travées enchondrales à *globuli ossei* (cf. *figure 2.7*), elles-mêmes entourées par un mince cortex périostique (cf. *figure 2.6*). La face concave du trochanter interne est résorptive – et sa face convexe + en apposition. Les travées internes du trochanter commencent à s'organiser spatialement. Section 110.1.3.T. **3.** Diaphyse d'un os long indéterminé. Section transversale. Cavité médullaire à minces travées endostéo-enchondrales. Ligne de Kastchenko marquant la limite de la maquette cartilagineuse (flèche) entourée par le cortex périostique profond. Section 98.4.1.T. **4.** Diaphyse fémorale, section transversale. Cortex externe d'origine périostique formé de fines travées séparées par de larges espaces vasculaires (cf. *figure 2.1*). Début d'incorporation dans le cortex d'un gros canal nourricier oblique (×). Section 101.1.0.T. **5.** Diaphyse fémorale, section transversale. Cortex périostique profond trabéculaire à disposition irrégulière, résorbé par l'érosion périmédullaire (–). Section 101.1.3.T. **6.** Fémur, métaphyse proximale, section transversale. La cavité centrale (×, probablement occupée in vivo par le cône cartilagineux médullaire) est limitée latéralement par quelques travées enchondrales associées à des baies d'érosion, l'ensemble étant entouré par un mince cortex périostique. Section 110.1.2.T. **7.** Idem, détail d'une travée osseuse périmédullaire enchondrale contenant des *globuli ossei* (G) associés à des restes de cartilage (C). **8.** Diaphyse fémorale, section transversale. Aspect général du cortex formant un tube limitant une cavité médullaire « libre ». Cortex primaire périostique très vascularisé, organisé localement en « lames » concentriques assez régulières (comparer avec la *figure 2.4*). Section 101.1.0.T.

amount of longitudinally oriented tubules, or pipes, which open either in the marrow cavity or at the surface of the cartilaginous ‘epiphysis’ [17, 20]. There is little doubt that some of those tubular spaces originate from the marrow cavity and worked as erosion bays carving into the cartilage towards the epiphysis. Their walls demonstrate local erosion of the cartilage and deposition of a thin coating of endochondral bone [1, 3, 19, 20] (*figure 1.3*). Towards the diaphysis, widening and fusion of the erosion bays lead to a bony spongiosa, where small islands of cartilage associated to *globuli ossei* may be observed within the bony trabeculae, evidence of the endochondral origin of the tissue, as also observed on some shaft cross sections (*figures 2.2 and 2.7*) – see above. Those metaphyseal regions are finished outwardly by a thin cortex of periosteal origin (*figure 2.6*) that ends up towards the epiphysis to form the ‘encoche d’ossification’ [12]. The tubules located most distally within the cartilage of the epiphysis might well be genuine cartilage canals [40], ontogenetically independent from the erosion bays, as they are developed among birds [40], rather than merely erosion bays developed from the marrow cavity [20]. The first interpretation is supported here by the widening in diameter of those canals towards the epiphyseal surface (*figures 1.1 and 1.2*). However, the other interpretation cannot be ruled out because the periphery of those canals is also involved in cartilage erosion and early endochondral bone deposition (*figure 1.6*). This clearly indicates that if those ‘pipes’ are indeed cartilage canals of the avian type, they nevertheless have been already colonized by connective-vascular tissues from the marrow at this ontogenetic stage [15, 19, 20, 40].

Some metaphyseal regions show a large central ‘well’ filled up by matrix, lined by thin bony trabeculae and sometimes containing small isolated islands of calcified cartilage (*figures 2.2–2.6*). This suggests the occurrence of a ‘cartilaginous medullary cone’ of the avian type [15], mostly formed by uncalcified cartilage (and hence not preserved by fossilization), as already suggested for the Cretaceous Theropod *Troodon* [20, 38, 39].

5. Local-specific characters and shape modelling

Anatomical shape and size differences within the skeleton are all the morphological consequences of histogenetic processes that may be observed or deciphered, even in fossils, by histological examination [34]. In that context, Lourinhã’s embryonic material will allow observations of unprecedented precision and detail for Theropods. Only some preliminary comments are in order here. Morphological dif-

ferences between long (limb) and short (vertebrae) endoskeletal bones seem directly linked (a) to the thickness of the calcified cartilage pads observed in fossils (itself probably correlated to the thickness of the uncalcified growth cartilage not preserved in fossils), (b) to the orientation and number of the intracartilaginous erosion bays and (c) to the relative speed of periosteal versus endochondral ossifications [2, 20, 22, 30, 36, 37] (compare *figures 1.2 and 1.5*).

In the femur, differentiation of an extensively off-centred articular head set laterally is in part caused by an extensive metaphyseal ‘region of undercutting’ [15], already well-differentiated and apparently very active at the ontogenetic stage available. Similarly, the proximal femoral extremity is already anatomically and histologically quite distinct from the well-developed internal trochanter of the embryos. In the proximal metaphysis of the femur, it is also possible to survey in detail the histological process responsible for the internal trochanter (*figure 2.2*) and fourth trochanter formations, and for the sequential relocation of the structures as growth takes place [11, 20]. Finally, some bone trabeculae of the spongiosa within the inner trochanter already show a peculiar spatial organization, forming locally a series of ‘V’ or ‘W’, suggesting together a ‘Warren beam’ structure (*figure 2.2*). To that extent, it is likely, as already suggested [6, 21] that the osseous skeleton differentiates very early under biomechanical strains that are integrated at once in its structure.

6. Concluding remarks

The types of periosteal bone tissues forming the cortex of the long bone shafts, and to a lesser extent, the lateral walls of the vertebrae, are quite typical of a primary (i.e. not reconstructed), hypervascularized ‘embryonic’ bone (*figure 2.1*), and likely to have been laid down at very high speed, probably higher than at least $20 \mu\text{m}\cdot\text{day}^{-1}$ [7, 8]. The epiphyseal structures, at least for the long bones, also suggest the possibility of an extremely active growth in length [1–3, 40]. The likely occurrence of genuine cartilage canals and probably also of a ‘medullary cartilaginous cone’ suggests a close relationship with the avian condition of long bone histogenesis [20], in agreement with phylogenetic conclusions based on independent data [13, 29].

Finally, apart from their exquisite anatomical and histological preservation, one of the most striking aspect of the Theropod embryos of the Jurassic of Lourinhã is the precision of the bone-specific anatomical details and their early differentiation. Those details (e.g. *figures 1.7, 1.8 and 2.2*) already show, at a much-reduced scale, Theropod-specific character states that

had been formerly observed and analysed, on adult skeletons the size of which could vary two orders of magnitude (100 factor) from the embryos. Of course, the histological construction of such anatomical details is fundamentally different in the embryos and adults, but the stability of such morphological characters all along the extended Theropod ‘ontogenic trajectory’ is striking. This suggests that the (genetic) control on shape is at the same time precocious, powerful and permanent, which is not contradictory with the influence of mecnanomorphic (epigenetic) factors, the possible influence of which has been stressed above [6, 21].

In spite of the very detailed morphological set of character states already available at the early ontogenic stage offered by the Lourinhã embryos, the non-availability of a growth series does not allow to know whether those details were retained along the ‘onto-

genic trajectory’ according to iso- or allometric relationships, and accordingly to securely deduce adult shapes and proportions from the embryos. A bivariate analysis of vertebral centra among *Allosaurus*, *Lourinhanosaurus* and the embryos demonstrates similar proportions in *Lourinhanosaurus* and the embryos while the proportions differ between them and *Allosaurus*. On this basis, the embryos could be tentatively referred to the Portuguese genus under the hypothesis of an isometric growth of the vertebral centra. This hypothesis could be amenable to a test if an isometric growth of the centra was indeed demonstrated in a Theropod where a growth series is available, e.g. *Allosaurus* from the Cleveland Lloyd Quarry. The final systematic status of the embryos will also have to take into account that several taxa of adult Theropods are now known from localities neighbouring the eggs’ site [24, 25].

Acknowledgements. We thank Mrs M.-M. Lath and Dr H. Francillon-Vicillot (Paris-7 University, UMR 8570) for their technical assistance with thin sectioning and plates computer processing. This work was supported by Project No. 225 BO “Échanges scientifiques franco-portugais”.

References

- [1] Barreto C., Wilsman N.J., Hypertrophic chondrocyte volume and growth rates in avian growth plates, *Res. Vet. Sci.* 56 (1994) 53–61.
- [2] Barreto C., Albrecht A.M., Bjorling D.E., Horner J.R., Wilsman N.J., Evidence of the growth plate and the growth of long bones in juvenile dinosaurs, *Science* 262 (1993) 2020–2023.
- [3] Barreto C., Dinosaur growth plates and dinosaur bone growth, in: Wolberg D.L., Stump E., Rosenberg G.D. (Eds.), *The Dino Fest. Internat.*, Publ. Acad. Natur. Sci., Philadelphia, PA, 1997, pp. 95–100.
- [4] de Buffrenil V., Mazin J.M., Bone histology of the Ichthyosaurs: comparative data and functional interpretation, *Paleobiology* 16 (1990) 435–447.
- [5] Carpenter K., Hirsch K.F., Horner J.R. (Eds.), *Dinosaurs eggs and babies*, Cambridge University Press, New York, 1994.
- [6] Carter D.R., Mikic B., Padian K., Epigenetic mechanical factors in the evolution of the long bones epiphyses, *Zool. J. Linn. Soc.* 123 (1998) 163–178.
- [7] Castanet J., Curry Rodgers K., Cubo J., Boisard J.-J., Periosteal bone growth rates in extant ratites (ostriches and emu). Implications for assessing growth in dinosaurs, *C. R. Acad. Sci. Paris, série III* 323 (2000) 543–550.
- [8] Castanet J., Grandin A., Abourachid A., de Ricqlès A., Expression de la dynamique de croissance dans la structure de l’os périostique chez *Anas platyrhynchos*, *C. R. Acad. Sci. Paris, série III* 319 (1996) 301–308.
- [9] Chiappe L.M., Coria R.A., Dingus L., Jackson F., Chinsamy A., Fox M., Sauropod dinosaur embryos from the Late Cretaceous of Patagonia, *Nature* 396 (1998) 258–261.
- [10] Chinsamy A., Dinosaur bone histology: implications and inferences, in: Rosenberg G.D., Wolberg D.L. (Eds.), *The Dino Fest, Paleont. Soc., spec. Publ.*, University of Tennessee Press, Knoxville TN, 1994, pp. 213–227.
- [11] Enlow D.H., *Principles of bone remodeling*, Thomas C.L., Springfield, IL, 1963.
- [12] Francillon-Vieillot H., de Buffrenil V., Castanet J., Geraudie J., Meunier F.-J., Sire J.-Y., Zylberberg L., de Ricqlès A., Microstructure and mineralization of vertebrates skeletal tissues, in: Carter J.G. (Ed.), *Skeletal Biomineralization: Patterns, Process and Evolutionary Trends, Vol. I*, Van Nostrand Reinhold, New York, 1990, pp. 471–548.
- [13] Gauthier J., Saurischian monophyly and the origin of birds, in: Padian K. (Ed.), *The origin of birds and the evolution of flight*, *Mem. Calif. Acad. Sci.* 8 (1986) 1–55.
- [14] Geist N.R., Jones T.D., Juvenile skeletal structure and the reproductive habits of dinosaurs, *Science* 272 (1996) 712–714.
- [15] Haines W.R., The primitive form of epiphysis in the long bones of tetrapods, *J. Anat.* 72 (1938) 323–343.
- [16] Horner J.R., Weishampel D., A comparative embryological study of two ornithischian dinosaurs, *Nature* 332 (1988) 256–257.
- [17] Horner J.R., Currie P.J., Embryonic and neonatal morphology and ontogeny of a new species of *Hypacrosaurus* (Ornithischia, Lambeosauridae) from Montana and Alberta, in: Carpenter K., Hirsch K.F., Horner J.R. (Eds.), *Dinosaurs eggs and babies*, Cambridge University Press, New York, 1994, pp. 312–336.
- [18] Horner J.R., de Ricqlès A., Padian K., Variation in dinosaur skeletochronology indicators: implication for age assesment and physiology, *Paleobiology* 25 (1999) 295–304.
- [19] Horner J.R., de Ricqlès A., Padian K., Long bone histology of the Hadrosaurid dinosaur *Maiasaura peeblesorum*: growth dynamics and physiology based on an ontogenetic series of skeletal elements, *J. Vert. Paleontol.* 20 (2000) 109–123.
- [20] Horner J.R., Padian K., de Ricqlès A., Comparative osteohistology of some embryonic and perinatal Archosaurs: developmental and behavioral implications for dinosaurs, *Paleobiology* 27 (2001) 39–58.

- [21] Huiskes R., Ruimermann R., Van Lenthe G.H., Janssen J.D., Effects of mechanical forces on maintenance and adaptation of form in trabecular bone, *Nature* 405 (2000) 704–706.
- [22] Kuettener K.E., Pauli B.U., Vascularity of cartilage, in: Hall B.K. (Ed.), *Cartilage, Structure, Function and Biochemistry*, Academic Press, New York, 1983, pp. 281–312.
- [23] Mateus O., *Lourinhanosaurus antunesi*, a new Jurassic Allosaurid (Dinosauria: Theropoda) from Lourinhã, Portugal, in: Telles Antunes M. (Ed.), *Upper Jurassic paleoenvironments in Portugal*, Mem. Acad. Ciências de Lisboa XXXVII (1998) 111–124.
- [24] Mateus O., Telles Antunes M., *Ceratosaurus* (Dinosauria: Theropoda), The Late Jurassic of Portugal, 31st Int. Geol. Congress, Rio de Janeiro, Brasil, 2000, Abstr. Vol.
- [25] Mateus O., Telles Antunes M., *Torvosaurus sp.* (Dinosauria: Theropoda) in the Late Jurassic of Portugal, in: Livro de Resumos do I Congresso Iberico de Paleontologia, 2000, pp. 115–117.
- [26] Mateus I., Mateus H., Telles Antunes M., Mateus O., Taquet P., Ribeiro V., Manupella G., Couvées, œufs et embryons d'un dinosaure théropode du Jurassique supérieur de Lourinhã (Portugal), *C. R. Acad. Sci. Paris, série IIA* 325 (1997) 71–78.
- [27] Mateus I., Mateus H., Telles Antunes M., Mateus O., Taquet P., Ribeiro V., Manupella G., Upper Jurassic Theropod Dinosaur embryos from Lourinhã (Portugal), in: Telles Antunes M. (Ed.), *Upper Jurassic paleoenvironments in Portugal*, Mem. Acad. Ciências de Lisboa XXXVII (1998) 101–109.
- [28] Norell M.A., Clark J.M., Chiappe L.M., Dashzeveg D., A nesting dinosaur, *Science* 378 (1996) 774–776.
- [29] Padian K., Chiappe L.M., The origin and early evolution of birds, *Biol. Rev.* 73 (1998) 1–42.
- [30] Reece R.L., Butler R., Some observations on the development of the long bones of ratite birds, *Austral. Vet. J.* 61 (1984) 403–405.
- [31] Reid R.E.H., Bone histology of the Cleveland-Lloyd dinosaurs and of dinosaurs in general. Part 1. Introduction: introduction to bone tissues, *Brigham Young University Geological studies* 41 (1996) 25–71.
- [32] Reid R.E.H., Dinosaurian physiology: the case for 'intermediate' dinosaurs, in: Farlow J.O., Brett-Surman M.K. (Eds.), *The complete Dinosaur*, Indiana Univ. Press, Bloomington, IN, 1997, pp. 450–473.
- [33] Reid R.E.H., How dinosaurs grew, in: Farlow J.O., Brett-Surman M.K. (Eds.), *The complete Dinosaur*, Indiana University Press, Bloomington, IN, 1997, pp. 403–413.
- [34] de Ricqlès A., Some remarks on Paleohistology from a comparative–evolutionary point of view, in: Grupe G., Garland A.N. (Eds.), *Histology of ancient Human bone: methods and diagnosis*, Springer, Berlin, 1993, pp. 37–77.
- [35] Sochava A.V., Microstructure of dinosaur egg-shell from Upper Cretaceous sediments of Northern Gobi, *Doklad. Akad. Nauk. SSSR, Moscow* 192 (5) (1970) 1137–1140.
- [36] Stark J.M., Ricklefs R.E., Avian growth and Development, Evolution within the Altricial–Precocial Spectrum, Oxford Ornithol. Series, Oxford University Press, Oxford, 1998.
- [37] Stark J.M., Quantitative design of the skeleton in bird hatchlings: does tissue compartmentalization limit post-hatching growth rate?, *J. Morphol.* 222 (1994) 113–131.
- [38] Varicchio D.J., Bone microstructure of the Upper Cretaceous theropod dinosaur *Troodon formosus*, *J. Vert. Paleontol.* 13 (1993) 99–104.
- [39] Varicchio D.J., Jackson F., Borlowski J., Horner J.R., Nest and egg clutches for the theropod dinosaur *Troodon formosus* and evolution of avian reproductive traits, *Nature* 385 (1997) 247–250.
- [40] Wilsman N.J., Van Sickle D.C., Cartilage canals, their morphology and distribution, *Anat. Record* 173 (1972) 79–94.
- [41] Wilson J.W., Histological techniques, in: Leiggi P., May P. (Eds.), *Vertebrate paleontological techniques*, Vol. 1, Cambridge University Press, NY, 1994, pp. 205–234.